

Aus dem Institut für klinische Zytologie und Zytopathologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchungen zur speziellen Bedeutung von Connexinen
bei der Entwicklung der Hautschichten und der Federfollikel
beim Hühnchen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von Anna Kristina Oberthür aus Düsseldorf

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
22.11.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. Jacob

Korreferent: Prof. Dr. A. Pagenstecher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen
Fotoverzeichnis
Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

2. Connexine

- 2.1. Aufbau der Gap Junctions
- 2.2. Aufbau der Connexine
- 2.3. Funktion der Connexine

3. Aufbau der Vogelhaut

- 3.1. Epidermis
- 3.2. Basalmembran
- 3.3. Dermis
- 3.4. Hypodermis
- 3.5. Apteris
- 3.6. Pteryla
- 3.7. Embryonale Entwicklung

4. Feder und Federfollikel

- 4.1. Aufbau der Feder
- 4.2. Aufbau der Federfollikel
- 4.3. Embryonale Entwicklung der Feder und der Federfollikel

5. Material und Methoden

- 5.1. Untersuchungsmaterial
- 5.2. Stadierung der Embryonen
- 5.3. Histologische und histochemische Methoden
 - 5.3.1. Einbettung
 - 5.3.2. Anfertigung histologischer Schnitte
 - 5.3.3. Übersichtsfärbungen
 - 5.3.4. Immunhistochemie
 - 5.3.4.1. Kontrollen
 - 5.3.4.2. Ergebnisdokumentation
 - 5.3.5. In-situ-Hybridisierung
 - 5.3.5.1. Herstellung der spezifischen Gensonden für die In-situ-Hybridisierung
 - 5.3.5.2. Reaktionsprotokoll In-situ-Hybridisierung
 - 5.3.5.3. Reagenzien für die In-situ-Hybridisierung
 - 5.3.5.4. Dokumentation

6. Ergebnisse

- 6.1. Ergebnisse der Immunhistochemie
 - 6.1.1. Connexin26
 - 6.1.2. Connexin30
 - 6.1.3. Connexin31
 - 6.1.4. Connexin32
 - 6.1.5. Connexin43

6.1.6. Connexin45

6.1.7. Ergebnisse / Tabellen

6.2. Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung

7. Diskussion

7.1. Kritische Betrachtung der Methodik

7.2. Kritische Betrachtung der Ergebnisse

7.2.1. Gap Junction und das Integument

7.2.2. Selektive Connexine bei der Entwicklung des Hühnchens

7.2.3. Selektive Connexine am Beispiel der Entwicklung der Labormaus

8. Zusammenfassung

9. Summary

10. Literaturverzeichnis

Abkürzungen

A	Arterie
BG	Blutgefäß
BM	Basalmembran
Cx	Connexin
D	Dermis
De	Depressor
E	Epidermis
ET	Entwicklungstag
Er	Erector
F	Fibroblasten
FB	Federbasis
FD	Follikeldermis
FE	Follikelepithel
FF	Federfollikel
FFi	Federfilament
FG	Fettgewebe
FH	Follikelhöhle
FM	Federmuskulatur
FP	Federpulpa
FS	Federspule
FSch	Federscheide
HD	Hypodermis
HE	Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung
IsH	In-situ-Hybridisierung
MV	mesenchymale Verdichtung
NG	Nervengewebe
P	Periderm
Re	Retractor
RS	Ramogensäule
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SI	Stratum intermedium

ST Stratum transitivity
V Vene

Fotoverzeichnis

Fig.1: Aufbau der Gap Junctions in schematischer Form
Fig.2: Schematische Darstellung interzellulärer Kanäle aus Connexinen
Fig.3: Molekularer Aufbau eines Connexins
Fig.4: HE Hühnerembryo 5. ET
Fig.5: HE Hühnerembryo 6. ET
Fig.6: HE Hühnerembryo 14. ET
Fig.7: HE Hühnerembryo 17. ET
Fig.8: Konturfeder eines Wellensittichs (Bsp.)
Fig.9: Querschnitt durch zwei Federäste
Fig.10: HE Hühnerembryo 19. ET Querschnitt Federfollikel
Fig.11: HE Hühnerembryo 19. ET Anordnung Federmuskulatur
Fig.12: HE Hühnerembryo 7. ET Federanlage
Fig.13: HE Hühnerembryo 10. ET Federplakode
Fig.14: Cx26 Hühnerembryo 5.ET
Fig.15: Cx26 Hühnerembryo 7.ET
Fig.16: Cx26 Hühnerembryo 11.ET
Fig.17: Cx26 Hühnerembryo 10.ET Federfollikel
Fig.18: Cx26 Hühnerembryo 11.ET Federfollikel
Fig.19: Cx26 Hühnerembryo 13.ET Federfollikel
Fig.20: Cx30 Hühnerembryo 4.ET
Fig.21: Cx30 Hühnerembryo 6.ET
Fig.22: Cx30 Hühnerembryo 10.ET
Fig.23: Cx30 Hühnerembryo 11.ET
Fig.24: Cx30 Hühnerembryo 17.ET
Fig.25: Cx30 Hühnerembryo 7.ET Federfollikel
Fig.26: Cx30 Hühnerembryo 10.ET Federfollikel
Fig.27: Cx30 Hühnerembryo 13.ET Federfollikel
Fig.28: Cx30 Hühnerembryo 15. ET Federfollikel
Fig.29: Cx30 Hühnerembryo 19.ET Federfollikel
Fig.30: Cx31 Hühnerembryo 7.ET

Fig.31: Cx31 Hühnerembryo 14.ET
Fig.32: Cx31 Hühnerembryo 17.ET
Fig.33: Cx31 Hühnerembryo 7.ET Federfollikel
Fig.34: Cx31 Hühnerembryo 9.ET Federfollikel
Fig.35: Cx31 Hühnerembryo 17.ET Federfollikel
Fig.36: Cx31 Hühnerembryo 19.ET Federfollikel
Fig.37: Cx32 Hühnerembryo 8.ET
Fig.38: Cx32 Hühnerembryo 14.ET
Fig.39: Cx32 Hühnerembryo 17.ET
Fig.40: Cx32 Hühnerembryo 11.ET Federfollikel
Fig.41: Cx32 Hühnerembryo 15.ET Federfollikel
Fig.42: Cx32 Hühnerembryo 17.ET
Fig.43: Cx32 Hühnerembryo 19.ET
Fig.44: Cx43 Hühnerembryo 5.ET
Fig.45: Cx43 Hühnerembryo 10.ET
Fig.46: Cx43 Hühnerembryo 13.ET
Fig.47: Cx43 Hühnerembryo 15.ET
Fig.48: Cx43 Hühnerembryo 17.ET
Fig.49: Cx43 Hühnerembryo 10.ET Federfollikel
Fig.50: Cx43 Hühnerembryo 11.ET Federfollikel
Fig.51: Cx43 Hühnerembryo 13.ET Federfollikel
Fig.52: Cx43 Hühnerembryo 17.ET Federfollikel
Fig.53: Cx45 Hühnerembryo 4.ET
Fig.54: Cx26 Hühnerembryo adult IsH
Fig.55: Cx30 Hühnerembryo 17.ET IsH
Fig.56: Cx30 Hühnerembryo 11.ET IsH
Fig.57: Cx32 Hühnerembryo 17.ET IsH
Fig.58: Negativkontrolle IsH

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der verwendeten Stadien nach Hamburger und Hamilton (1951)

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Tabelle 3: Reaktionsprotokoll für die Immunhistochemie

Tabelle 4: Reaktionsprotokoll für die In-situ-Hybridisierung

Tabelle 5: Connexinexpression in den sich entwickelnden Hautschichten

Tabelle 6: Connexinexpression in den sich entwickelnden Federfollikel

1. Einleitung

Connexine sind Kanalproteine, die zwei benachbarte Zellen miteinander verbinden und einen Stoffaustausch zwischen den beiden Zellen ermöglichen, ohne dass dazu ein Umweg über den extrazellulären Raum benötigt wird. Connexine sind daher die Bausteine der Gap Junctions, in denen die Plasmalemmata benachbarter Zellen bis auf etwa 3 nm aneinander liegen und so den extrazellulären Raum stark verschmälern. Jede Zellmembran lagert in den Gap Junctions Halbkanäle ein, die mit den entsprechenden Halbkanälen der benachbarten Zellen den vollständigen transmembranalen Kanal bilden. So können z. B. kleinere Moleküle aber auch Ionen ungehindert von einer Zelle in die andere übertreten, ohne erst aus der Zelle ausgeschleust und in die benachbarte Zelle wieder eingeschleust zu werden.

Vor allem embryonales Gewebe, das eine hohe Stoffwechselaktivität zeigt, macht sich diesen Mechanismus zu Eigen. Viele Zellen werden erst ausgebildet, um bestimmte Gewebe zu bilden, die bei einem erwachsenen Tier schon vorhanden sind. Dort ist die Aufgabe eher die Erhaltung bzw. Reparatur der Gewebetypen und nicht eine Neuentstehung. So sind im embryonalen Gewebe vor allem Zellen vorhanden, die sich noch ausdifferenzieren müssen und können. Sie tragen die Anlage zur speziellen Gewebeausdifferenzierung in sich. Die embryonalen Zellen brauchen nicht nur die Information zu welchem Gewebe sie ausdifferenzieren sollen, sondern auch in welchem Umfang. So müssen sie untereinander kommunizieren, wozu sie die transmembranalen Kanäle benötigen.

Da diese Kanäle aus Connexinen bestehen, haben wir uns entschlossen, die Expression bestimmter Connexine in embryonalem Gewebe und den Verlauf in der Entwicklung nachzuweisen. Dazu beschränkten wir uns auf die Entwicklung der Hautschichten und des Federfollikels beim Hühnchen. Die Besonderheit während der Entwicklung des Federfollikels besteht darin, dass diese hochkomplexen Gewebe aus zwei verschiedenen Ursprungsgeweben entstehen, dem Ektoderm und dem Ektomesoderm. Im Laufe der embryonalen Entwicklung werden verschiedene Connexine in den ektodermalen und mesodermalen Zellen exprimiert. Um den Verlauf der Entwicklung relevant beobachten zu können, entschlossen wir uns, nur Connexine (Cx) zu untersuchen, die nachweislich in der Haut des Hühnchens vorkommen, d.h. Cx26, Cx30, Cx31, Cx32, Cx43 und Cx45. Die Nachweise wurden durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen mit Hilfe der Immunhistochemie durchgeführt. Zur

besseren Spezifizierung der Nachweise diene die In-situ-Hybridisierung, anhand derer die spezifische mRNA ausgesuchter Connexine (Cx26, Cx30, Cx32) kontrolliert wurde.

2. Connexine

Das Gewebe kann mittels interzellulärer Übergänge mit wenig Widerstand über kurze Wege zwischen einzelnen Zellen kommunizieren. Diese Kommunikationszonen werden als Gap Junctions bezeichnet. Die Gap Junctions bilden eine einheitliche Form der Kommunikation, wobei der Austausch von Molekülen direkt stattfinden kann, ohne Sekretion in den Interzellularraum (REVEL, 1988). Dieses wird auch als direkte Koordination der Zellaktivität bezeichnet, da ein direkter Kontakt zwischen benachbarten Zellen besteht. Dazu sind neben den Gap Junctions z. B. auch die Adherens Junctions im Stande. Beide Kommunikationseinheiten bilden transmembranöse Transportmoleküle. Bei den Gap Junctions sind dies die Connexine, auf deren Struktur noch genauer eingegangen wird, und die in dieser Arbeit zum Nachweis embryonaler Zell-Zell-Kommunikation von großer Bedeutung sind.

Im Gegensatz dazu wird bei der indirekten Zellkommunikation der extrazelluläre Raum mit einbezogen. So werden Zytokine, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Hormone und nicht-kollagene Matrixproteine von der Zelle in den extrazellulären Raum abgegeben und oft über längere Strecken, z.B. über die Blutbahn, transportiert und von der Zielzelle wieder aufgenommen (SCHNAPPER, 2007). In diesem Fall sind verschiedene Proteine in der Spender- und Empfängerzelle notwendig. Der Unterschied zwischen der direkten und indirekten Kommunikation liegt dementsprechend nicht nur in den verschiedenen Proteinen, die sich in der Zellmembran der einzelnen Zellen befinden, sondern auch in der unterschiedlichen Zellanordnung zueinander. So befinden sich bei der direkten Kommunikation die miteinander kommunizierenden Zellen dicht nebeneinander und bilden bestimmte Kommunikationseinheiten. Solche Zusammenschlüsse stellen funktionelle Einheiten dar, aus denen sich während der Entwicklung bestimmte Gewebe entwickeln können.

In der vorliegenden Dissertation geht es um die direkte Kommunikation von Zellen mittels Gap Junctions. Die Connexine werden ab einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung von allen Säugetierzellen exprimiert. Die Ausnahme bilden voll

ausdifferenzierte Zellen, wie z.B. Skelettmuskelzellen, einige Neurone, die meisten zirkulierende Blutzellen und Spermatozyten (BRUZZONE et al., 1996b).

Die interzellulären Kanäle nehmen an diversen Funktionen teil, so z. B. an der Kontraktion von kardialer und glatter Muskulatur (PAGE und SHIBATA, 1981), der metabolischen Kooperation in gefäßarmen Organen oder der Embryogenese (LARSEN und WERT, 1988; GOODENOUGH, 1992).

Die Durchgängigkeit der interzellulären Kanäle für Second Messenger, spielt eine wichtige Rolle während der Entwicklung der Gewebeformation (CAVENEY, 1985; GUTHRIE und GILULA, 1989; KIDDER, 1992; WARNER, 1992). Auch bei der Kontrolle des Zellwachstums (YAMASAKI, 1990; LOEWENSTEIN und ROSE, 1992; HOTZ-WAGENBLATT und SHALLOWAY, 1993) und der ontogenetischen Transformation übernehmen Connexine eine wichtige Aufgabe (TROSKO und RUCH, 1998).

2.1. Aufbau der Gap Junctions

Gap Junctions sind meist irregulär geformte flächige Anteile in der Plasmamembran mit einem Durchmesser von ein bis fünf μm , in denen sich eine Aggregation hunderter von Gap Junction - Kanälen befindet, der Nexus. In diesen Nexus liegen die Plasmamembranen sehr dicht aneinander. Sie werden nur durch einen schmalen Spalt von ca. 3 nm getrennt (ROBERTSON, 1963; BENEDETTI und EMMELOT, 1965; REVEL und KARNOVSKY, 1967).

Mittels der Atomic Force Microscopy konnte nachgewiesen werden, dass in den Nexus alle 9-10 nm ein Partikel in hexagonalem Muster vorhanden ist (HOH et al., 1993; LAL et al., 1995). Diese Partikel sind Halbkanäle benachbarter Zellmembranen, auch Connexone genannt. Mittels Röntgenstrahl-Defraktionierung (BRUZZONE et al., 1994) und Low-Dose-Elektronen-Mikrographie (UNWIN und ZAMPIGHI, 1980) konnte gezeigt werden, dass jedes Connexon einen Zylinder mit einer wässrigen Pore im Zentrum formt, der von einem Wall umgeben ist, der sich aus sechs Proteinuntereinheiten zusammensetzt (MAKOWSKI et al., 1977). Die Pore ist durchgängig für kleinere Moleküle bis zu einer Größe von 1 kDalton, wie z.B. Metabolite, Ionen und Second Messenger (BRUZZONE et al., 1996a).

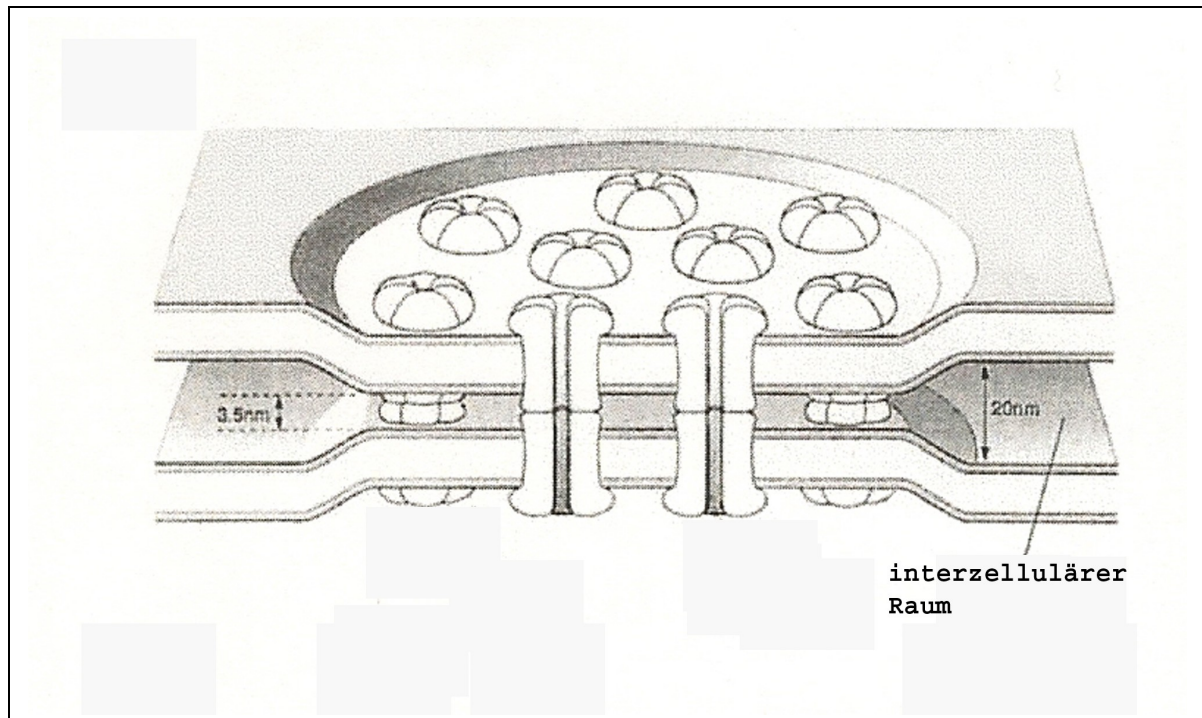


Fig.1: Aufbau der Gap Junctions in schematischer Form, wobei der normale interzelluläre Spalt etwa 20 nm beträgt, der in den Gap Junctions auf etwa 3,5 nm verengt ist (aus BRUZZONE et al., 1996 b; nachbearbeitet)

Die einzelnen Untereinheiten heißen Connexine (UNWIN und ZAMPIGHI, 1980; MAKOWSKI, 1988; SOSINSKY et al., 1988; YEAGER und GILULA, 1992; CASCIO et al., 1995; UNGER et al., 1997; UNGER et al., 1999).

Durch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPCC) wurde deutlich, dass es Unterschiede in der Struktur der einzelnen Proteine gibt, die die Halbkanäle bilden (GROS et al., 1983). Anfangs fand man diese Unterschiede in den Gap Junctions von Rattenleber und Rattenherz. Auch die Mikrosequenzierung von der amino-terminalen Region von Leber- und Herzproteinen ergab Ähnlichkeiten und Unterschiede (NICHOLSON et al., 1985). So konnte gezeigt werden, dass Cx43 in der Leber (PAUL, 1986) und im Herzen (BEYER et al., 1987) der Ratte homologe Sequenzen zu dem Cx43 des Menschen und des Rindes aufweist (HEYNKES et al., 1986; KUMAR und GILULA, 1986).

Viele dieser Connexine werden nicht nur in einem Gewebetyp exprimiert, so dass eine einheitliche Nomenklatur gefunden werden musste, die die Mitglieder dieser Proteine in eine „Familie“ einteilt. Die allgemein gültige Nomenklatur nach BEYER et al. (1987) wird hier zusammenfassend beschrieben. Sie beinhaltet als erstes die Abkürzung für Connexine: Cx. Dahinter steht die Molekülmasse der Connexine, die herausgefunden

wurde, in dem man die DNA-Sequenzen geklont und daraus die betreffenden Connexine wieder synthetisiert hat. So besteht z.B. das Cx43 aus einer Molekülmasse von 43 kDalton. Homologen Cx aus verschiedenen Organismen wird ein Präfix vorangestellt, um zu zeigen von welcher Spezies sie stammen. Dabei stehen: r=rat, ch=chicken, xen=Xenopus, b=bovine, h=human. Connexine mit einer sehr ähnlichen Molekülmasse werden mit einer Dezimalzahl weiter charakterisiert, so z.B. Cx30.1. Dieses System gestattet zwar eine eindeutige Identifikation der Connexine, allerdings lassen sich nicht die funktionellen Ähnlichkeiten einzelner Connexine miteinander in Bezug setzen. So haben teilweise funktionell homologe Connexine zweier verschiedener Spezies oft eine unterschiedliche Molekülmasse, z.B. rCx43, bCx44 und chCx56.

Eine alternative Nomenklatur wurde von RISEK et al. (1990) und BENNETT et al. (1991) vorgeschlagen, basierend auf zwei Haupt- und Unterklassen, a oder Typ II und b oder Typ I. Diese konnte sich aber nicht durchsetzen.

In der vorliegenden Dissertation wird die heute allgemeingültige Nomenklatur von BEYER et al. (1987) benutzt.

Auch der Aufbau der einzelnen Connexone zeigt Unterschiede. So gibt es homomerische Connexone, die aus sechs gleichen Connexinen bestehen. Heteromerische Connexine bestehen aus unterschiedlichen Connexinisotypen. Daraus lässt sich ableiten, dass es auch unterschiedliche Kanaltypen geben muss. So gibt es homotypische Kanäle, die aus gleichen Connexonen bestehen, die wiederum aus gleichen Connexinen gebildet werden. Dazu gibt es heterotypische Kanäle aus zwei verschiedenen Connexonen, die aber jeder für sich nur aus einem Connexin-Typ bestehen. Als dritte Variante ist noch der heteromerische Kanal bekannt, der aus verschiedenen Connexonen besteht, die aus verschiedenen Connexinen entstehen (HOUGHTON, 2005).

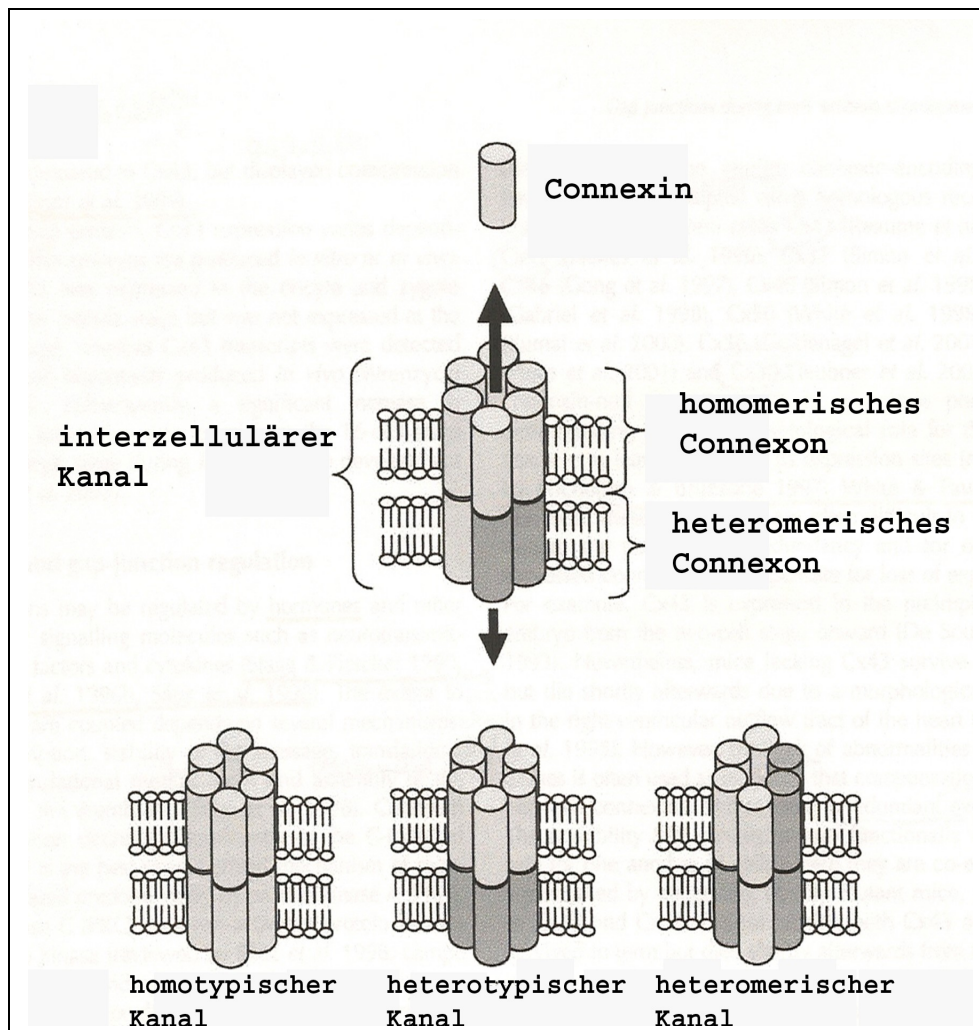


Fig.2: Schematische Darstellung interzellulärer Kanäle aus Connexinen (aus HOUGHTON, 2005; nachbearbeitet)

So können verschiedene Connexine miteinander verschiedene Connexone bilden. Aber nicht alle Connexin-Kombinationen können gemeinsam funktionierende Connexone hervorbringen. So ist z.B. Cx31 funktionell nur in homotypischer Konfiguration nachweisbar, nicht aber in heterotypischer Kombination mit Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 (ELFGANG et al., 1995). Cx40 hingegen kann funktionelle Einheiten mit Cx37 bilden, versagt aber bei der Paarung mit Cx32, Cx43, Cx46 und Cx50. Cx46 interagiert mit allen anderen Connexinen, v.a. mit Cx40 (WHITE et al., 1995).

2.2. Aufbau der Connexine

Es war möglich, das Genom von 19 Connexine bei der Maus und 20 verschiedenen Connexine beim Menschen zu identifizieren (BONDAREV et al., 2001; LU et al., 2002; NIELSEN et al., 2002; WILLECKE et al., 2002). Diese Genome wurden auf verschiedenen Chromosomen entdeckt, wobei es eine Häufung auf dem Chromosom 4 der Maus gibt (HENNEMANN et al., 1992), das dem Chromosom 2 des Menschen entspricht. Gleichzeitig wurde herausgefunden, dass sich die Cx32-Clone verschiedener Gewebe bei einer Spezies auch unterscheiden können. So differieren die Cx32-Clone der Ratten- oder Mäuseleber von denjenigen der Ischiasnerven und der embryonalen Stammzellen (SÖHL et al., 1996). Ein genetischer Austausch (linkage) wurde zwischen Connexinen beobachtet die relativ unterschiedlich in ihrer Aminosäuresequenz sind, z.B. zwischen Cx26 und Cx46, Cx31.1 und Cx37 (HAEFLIGER et al., 1992). Diese Beziehung zeigt auf, dass eine Genduplikation relativ früh in der Evolution der Connexin-Familie vorkommt.

Obwohl sich die Molekülmasse der Connexine unterscheidet, zeigen sie doch alle einen gleichen Grundaufbau. So besitzt jedes Connexin vier transmembranöse (M1 – M4) Domänen, zwei extrazelluläre Schleifen (E1 und E2) und drei zytoplasmatische Anteile. Dieses Modell wurde für die Connexine als zustimmend erklärt und nachgewiesen durch limitierte Proteolyse, spezifische Antikörper und künstliche Glykolisierung (ZIMMER et al., 1987; GOODENOUGH et al., 1988; HERTZBERG et al., 1988; MILKS et al., 1988; YANCEY et al., 1989; EVANS et al., 1992; DAHL et al., 1994; FALK et al., 1994; ZHANG und NICHOLSON, 1994). Für die Aufklärung der Topologie wurden Cx26, Cx32 und Cx43 herangezogen, die vorher aus Herz und Leber von Mäusen isoliert worden waren. Das Aminoende (NT), das Carboxyende (CT) und eine Schleife (CL) in der Mitte des Proteins sind alle auf der zytoplasmatischen Seite der junktionalen Membran lokalisiert und die extrazellulären Domänen an der extrazellulären Membranoberfläche der junktionalen Zone (ZIMMER et al., 1987; HERTZBERG et al., 1988; MILKS et al., 1988; YANCEY et al., 1989; ZHANG und NICHOLSON, 1994; QUIST et al., 2000). Weiterhin bestehen die Connexine aus vier hydrophoben Domänen mit einem Carboxy-terminalen, hydrophilen Schwanz. Drei hydrophile Domänen trennen die hydrophoben Regionen (HEYNKES et al., 1986; PAUL, 1986; BEYER et al., 1987).

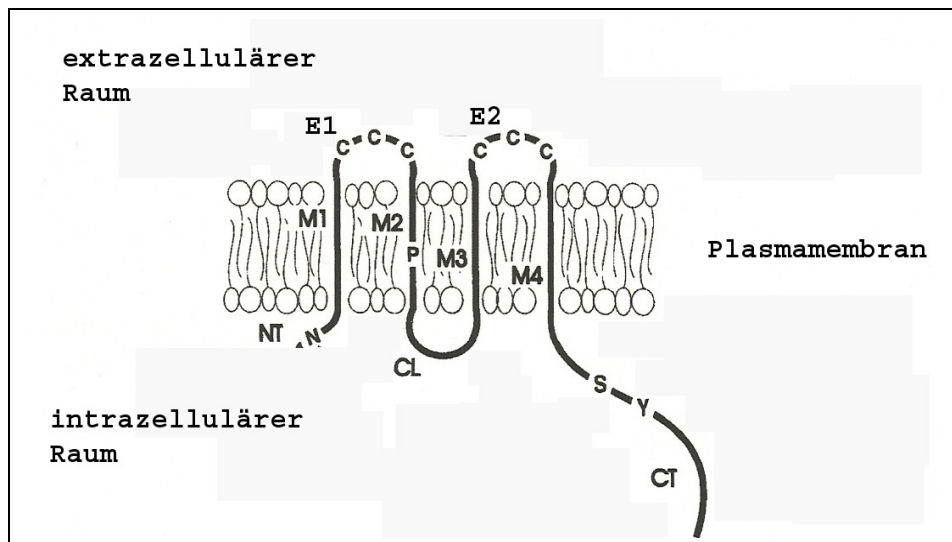


Fig.3: Molekularer Aufbau eines Connexins aus vier transmembranösen Proteinen (M1 – M4), zwei extrazellulären Schleifen (E1, E2), drei zytoplasmatischen Anteilen, bestehend aus einem Aminoende (NT), einer intrazellulären Schleife (CL) und einem Carboxyende (CT) (aus BRUZZONE et al., 1996 b; nachbearbeitet)

In den extrazellulären Anteilen, die Schleifen bilden, sogenannte Loops, zeigen sich drei Cystein-Anteile in einer konservierten Sequenz, d.h., sie sind in allen Connexinen vorhanden, nur das rCx31 zeigt eine Abweichung mit einem anderen Muster in der zweiten extrazellulären Schleife (HOH et al., 1991). Die transmembranösen Anteile und die sehr kurze zytoplasmatische Portion am N-Terminus sind genetisch gesehen sehr gut konserviert und so bei jedem Connexin identisch, während die extrazellulären Schleifen, die intrazelluläre Schleife und das Carboxyende für jedes Connexin in Länge und Aminosäureabfolge einzigartig ist (BEYER et al., 1990; WILLECKE et al., 1991; KUMAR und GILULA, 1992).

Die Cysteinreste formen intramolekulare, aber nicht intermolekulare Disulfidbrücken, die zwei extrazelluläre Schleifen verschiedener Connexine miteinander verbinden, z.B. bei Cx32 und Cx43 (DUPONT et al., 1989; RAHMAN und EVANS, 1991; JOHN und REVEL, 1991). Es ist möglich, dass alle Connexine in der Lage sind, solche Disulfidbrücken auszubilden. Wahrscheinlich macht die Kombination des langen Carbohydrat-Anteiles die Oligomerisation der Connexine schwierig und stört bei der Kopf-zu-Kopf-Interaktion der einzelnen Connexone. So ist die zweite extrazelluläre Schleife (E2) dafür verantwortlich, welche Connexine zur Bildung heterotypischer Kanäle miteinander interagieren können (WHITE et al., 1994; White et al., 1995, WHITE und BRUZZONE, 1996).

Die Pore der Gap Junctions, der eigentliche Kanal, wird von einem Wall umgeben, der sich aus den extrazellulären Anteilen der Connexone ergibt und somit anderen Membrankanälen ähnelt. Die Inter-Connexon-Bindungen entstehen aus nicht-kovalenten Bindungen (GOSHROY et al., 1995). Sie müssen stark genug sein, um den Kanal zum extrazellulären Raum hin abzuschließen. Diese Ähnlichkeiten lassen vermuten, dass es ein einheitliches Design für die Bildung von Membrankanälen gibt und auch der molekulare Mechanismus zum Öffnen und Schließen der Kanäle generellen Regeln unterliegt (UNWIN, 1989). Die transmembranöse Region ist verantwortlich für die Aufspannung in der Plasmamembran und die Formung der wässrigen Pore in der Membran. Die drei Regionen M1, M2 und M4 besitzen viele hydrophobe Aminosäurenreste, wohingegen M3 viele hydrophile und auch geladene Aminosäuren enthält. Es kann somit eine amphipathische alpha-Helix bilden. Diese hydrophile Seite scheint die Pore des Kanals zu bilden (BENETT et al., 1991). Andererseits scheint M3 auch essentiell für die Bindung der Connexine untereinander bei der Bildung der Connexone zu sein (YEAGER et al., 1998). Strukturstudien haben weiterhin herausgefunden, dass Regionen von zwei alpha-Helices den inneren Wall des Kanals umsäumen (UNGER et al., 1999). So besitzen mindestens zwei, wahrscheinlich sogar alle vier der Transmembrandomänen eine alpha-helikale Struktur (UNGER et al., 1997; YEAGER, 1998). Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass M1 und M3 bei Cx43 die Pore umsäumen (ZHOU et al., 1997) und bei Cx32 zusätzlich M2 (SKERRETT et al., 2002). Aufgrund einer anderen Aminosäuresequenz in der zweiten extrazellulären Domäne, zeigt das Cx32 einen anderen Aufbau. Dort bilden mehrere Aminosäuren eine Pore, die einer beta-Tonne ähnelt (DAHL et al., 1994). Diese Struktur wiederum ähnelt der eines Ionen-Kanals (JAN und JAN, 1994; MACKINNON, 1995).

Jedes Gewebe exprimiert mehr als einen Connexin-Typ. Bestimmte Kombinationen von Connexinen werden in einem bestimmten Gewebe oder Zelltyp koexprimiert. So produzieren viele Epithelien z.B. Cx26 und Cx32 (NICHOLSON et al., 1987; TRAUB et al., 1989; STUTENKEMPER et al., 1992; MEDA et al., 1993; KOJIMA et al., 1995). Studien mit Hilfe von Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie haben gezeigt, dass verschiedene, oft auch mehrere Connexine in derselben Zelle präsent sind. Sogar in demselben Gap Junction-Gebiet (NICHOLSON et al., 1987; TRAUB et al., 1989; PAUL et al., 1991; SAINIO et al., 1992; GOURDIE et al., 1993; WINTERHAGER et al., 1993; RISEK et al., 1994). Bestätigt wurde dies auch durch elektrophysiologische Untersuchungen (SPRAY et al., 1991). Connexine, die in einer Zelle koexprimiert

werden, kann man teilweise im gleichen Gap Junction-Plaques nachweisen (NICHOLSON et al., 1987; TRAUB et al., 1989; DARROW et al., 1995; OKUMA et al., 1996; YEH et al., 1998; YAMANAKA et al., 2001; NAGY et al., 2001; HONJO et al., 2002) oder auch in verschiedenen Membrananteilen (SPRAY et al., 1991; GUERRIER et al., 1995). Schon MUSIL und GOODENOUGH (1991) konnten Connexone auch außerhalb der Zell-zu-Zell-Kontakte in der Plasmamembran nachweisen.

Die Anzahl der Connexine wird über post-transkriptionale Mechanismen reguliert. Connexine können in dem gleichen Zelltyp unterschiedlich reguliert werden. Der gleiche Connexin-Typ kann wiederum in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich reguliert werden. Die meisten Zelltypen exprimieren zwei verschiedene Connexine und im Präzedenzfall heteromere, ligandengesteuerte Kanäle (JAN und JAN, 1990; CATTERALL, 1995). Die Expression mehrerer Connexine kontrolliert die Durchlässigkeit der Gap Junction-Kanäle über komplexe intermolekulare Interaktionen (KOVAL et al., 1995). Gap Junctions sind im Allgemeinen durchlässig für zyklische Nukleotide, Kalzium-Ionen und Inositol-Triphosphate (LAWRENCE et al., 1978; MURRAY und FLETCHER, 1984; DUNLOP et al., 1987; SAEZ et al., 1989a; SANDBERG et al., 1992).

Ein geschichtetes, verhornendes Epithel wie die Epidermis, macht sich fünf verschiedene Connexine in einem komplexen entwicklungsregulierten Muster der Expression zunutze, das unter verschiedenen Funktionen der einzelnen Stadien variiert (RISEK et al., 1992; BUTTERWECK et al., 1994a; GOLIGER und PAUL, 1994 und 1995; SALOMON et al., 1994). Die Expression der Connexin-Moleküle wiederum steht unter transkriptionaler Kontrolle. Die Connexine variieren in ihrer Funktion mit ihrem physiologischen Stadium und in den Antworten auf rezeptoraktivierten Signalwegen, giftigen Agenzien, zellulärer Proliferation und Transformation (SPRAY et al., 1987; TRAUB et al., 1987).

Der Ort, an dem die Connexine zu Connexonen oligomerisieren, ist abhängig vom Connexin-Typ (MUSIL und GOODENOUGH, 1993; RAHMAN et al., 1993; DIEZ et al., 1999; MARTIN et al., 2001; DAS SARMA et al., 2002). So setzt sich z.B. das Cx32 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder im ER-Golgi-Zwischen-Kompartiment zusammen, während das Cx43 im Trans-Golgi-Netzwerk aufgebaut wird (MUSIL und GOODENOUGH, 1993; RAHMAN et al., 1993; DIEZ et al., 1999; MARTIN et al., 2001; DAS SARMA et al., 2002). Connexone, die aus Cx26 bestehen, können entweder direkt

posttranslational in die Plasmamembran eingebaut werden (AHMAD und EVANS, 2002) oder sie werden im ER/Golgi-Zwischen-Kompartiment oligomerisiert (DIEZ et al., 1999). Auch SOSINSKY (1995) konnte zeigen, dass Cx26 und Cx32 heteromere Connexone ausbilden können. Die neu synthetisierten Connexine können über verschiedene Wege zur Plasmamembran bzw. ihrem spezifischen Ziel transportiert werden. Für diesen Transport sind z.B. beim Cx32 die transmembranösen Proteine, nicht aber die zytoplasmatischen Anteile erforderlich (LEUBE, 1995). So werden einige Connexine zu den Gap Junction Nexus in zytoplasmatischen Vesikeln (JORDAN et al., 2001) entlang der Mikrotubuli (LAUF et al., 2002) transportiert. Dieser Weg kann über die Hemmstoffe Brefeldin A, welches das Golgi-Kompartiment spaltet, und Nocodazole, ein Protein, das Mikrotubuli spaltet, dargestellt werden (GEORGE et al., 1999; MARTIN et al., 2001). Große junctionale Plaques werden durch die Vereinigung kleinerer junctionaler Plaques geformt (KISTLER et al., 1993; HOLM et al., 1999).

2.3. Funktion der Connexine

Biochemische und elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass Connexone erst in die Plasmamembran außerhalb der „Junctional areas“ transportiert werden, wo sie funktionell zwischen offenen und geschlossenen Zuständen wechseln. Erst danach fügen sie sich zu den Junctionalen Nexus zusammen (MUSIL and GOODENOUGH, 1991; BRUZZONE et al., 1996b). Zum Offenhalten der Kanäle kommen unterschiedliche Mechanismen in Frage: Extrinsische Faktoren, die nicht Teil des Kanals sind, z.B. Adhäsionsmoleküle, Lektine, Lipide, Kalzium-Ionen und andere Ionen, oder Intrinsische Faktoren, bestimmte Regionen des Connexin-Moleküls (DAHL et al., 1992).

Das so genannte „Gating“ ist definiert als der rückgängig zu machende Zustand zwischen der offenen und der geschlossenen Konfiguration der vorgeformten Kanäle. Es kann das Ergebnis von nicht-kovalenten Bindungen (elektrostatischen, van-der-Waalschen-Interaktionen) oder kovalenten (Phosphorylierung) Bindungen der Kanalstrukturen sein (BRUZZONE et al., 1996b).

Das Öffnen und Schließen der Connexone oder auch der Halbkanäle ist abhängig vom umgebenen Milieu und von den Connexinen, aus denen es besteht. So konnte gezeigt werden, dass z.B. ein homomerisches Connexon aus Cx43, durch eine niedrige

Kalziumkonzentration geöffnet wird. Wohingegen es durch die Aktivierung eines Proteinkinase C abhängigen Schaltweges, der zu einer Phosphorylierung des Cx43 führt, wieder geschlossen wird (LI et al., 1996; LIU et al., 1997). Auch nach einer extrazellulären Applikation von verschiedenen Ionen, wie z.B. Lanthanidkationen, La^{3+} (JOHN et al., 1999; KONDO et al., 2000; CONTRERAS et al., 2002), Gd^{3+} (STOUT et al., 2002) oder der Behandlung mit Gap Junction-Kanalblockern, wie Octanol, Heptanol, Carbenoxolene, Oleamide, Halothane und bestimmten Glycerinsäuren, konnte das Schließen der Halbkanäle beobachtet werden. Eine Hyperpolarisation der Plasmamembran führt zum Schließen von Connexonen bestehend aus Cx30, Cx44, Cx46, Cx50, Cx56 (EBIHARA und STEINER, 1993; GUPTA et al., 1994; TREXLER et al., 1996; VALIUNAS und WEINGART, 2000).

Die Leitung von homomerischen Halbkanälen aus Cx30, Cx32, Cx43, Cx45, Cx46 und Cx50 wurde über Spannungsklammern in Zellverbänden oder ausgeschnittenen Patch-Konfigurationen gemessen (TREXLER et al., 1996; EBIHARA et al., 1999; VALINUAS und WEINGART, 2000; ESKANDARI et al., 2002; VALINUAS, 2002).

Ein weiterer Nachweis für den funktionellen Zustand von Connexonen ist ihre Durchgängigkeit für bestimmte Farbstoffe. So ist Cx43 z.B. durchgängig für Lucifer yellow, Ethidiumbromid, Carboxyfluorescein, 7-Hydroxycoumarin-3-Carboxylsäure und Fura-2 (ELFGANG et al., 1995; LI et al., 1996; LIU et al., 1997; VANOYE et al., 1999; KONDO et al., 2000; MANTHEY et al., 2001; CONTRERAS et al., 2002; PLOTKIN et al., 2002; STOUT et al., 2002) und andere kleinere Moleküle, wie NAD^+ , ATP und IP_3 (BRUZZONE et al., 2001a; ROMANELLO und DANDREA, 2001; ARCUNIO et al., 2002; STOUT et al., 2002). ARCUNIO et al. (2002) konnten auch nachweisen, dass Cx32 für ATP durchgängig ist.

Das Öffnen der Halbkanäle spielt eine relevante Rolle unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. QUIST et al. (2000) wiesen nach, dass Cx43-Halbkanäle das Zellvolumen regulieren, in Anpassung an die Änderung der extrazellulären physiologischen Kalziumkonzentration in einer osmotischen Situation. So würde z.B. das Inhibitions-induzierte Öffnen von Cx43-Halbkanälen den Mechanismus beschleunigen, der die Zelle zum Absterben führt (CONTRERAS et al., 2002).

Frühere Studien haben simple Regulationsmechanismen gezeigt, bei denen Connexine über eine Proteinkinase A cAMP-abhängig stimuliert werden können (FLAGG - NEWTON et al., 1981; WIENER und LOEWENSTEIN, 1983; SAEZ et al., 1986) und

inhibiert durch Kopplung einer Proteinkinase C , einer Kalzium-Phospholipid-abhängigen Kinase (YOTTI et al., 1979; DOTTO et al., 1989; BRISETTE et al., 1991). Alle untersuchten Connexine, mit Ausnahme des Cx26, sind Phosphoproteine (TRAUB et al., 1989; SAEZ et al., 1990; SAEZ et al., 1998; COOPER et al., 2000; LAMPE und LAU, 2000). Cx26 ist ein nicht-phosphoryliertes Protein, das die Möglichkeit besitzt, verbindende Abläufe zu induzieren (BARRIO et al., 1991). Die erste direkte Connexin-Phosphorylierung konnte an Cx32 in Hepatozyten nachgewiesen werden (SAEZ et al., 1986; TRAUB et al., 1987).

Einige der Connexine werden vor dem Einsetzen in die Plasmamembran phosphoryliert. Andere dagegen werden erst in der Plasmamembran phosphoryliert, um den Kanal zu öffnen oder zu schließen. Die spezifische Phosphorylierung der meisten Connexine ist noch nicht aufgeklärt. Zu diesen Phosphoproteinen gehören Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50, chCx56 (MUSIL et al., 1990a; LAIRD et al., 1991; JIANG et al., 1993; BERTHOUD et al., 1994; BUTTERWECK et al., 1994b; LAING et al., 1994). Bei Beobachtungen von Farbstoffkopplungen und einzelnen Kanälen von Cx26, Cx43 und Cx45 zeigt sich die Existenz von einer Connexin-spezifischen Regulation mit einzelner Phosphorylierung und einer positiven Korrelation zwischen einer niedrigen Frequenz und einer abnehmenden Permeabilität (KWAK et al., 1995).

Die Antwort der Kanäle wird durch verschiedene pharmakologische Agenzien, sowie extrazelluläre und intrazelluläre Botenstoffe moduliert. Wie die herkömmlichen Ionenkanäle kann die elektrophysiologische Leitung der Connexine durch die Potenzialdifferenz zwischen den einzelnen Zellen verändert werden (BRUZZONE et al., 1996b). Der Verschluss der Kanäle folgt dem Alles-oder-Nichts-Prinzip (VERSELIS et al., 1986).

Chemische Inhibitoren der Connexine scheinen der pH-Wert (TURIN und WARNER, 1977) und die Kalziumkonzentration im Zytosol (ROSE und LOEWENSTEIN, 1976) zu sein. Es ist allerdings noch nicht ganz geklärt, ob die pH-abhängige Durchlässigkeit ein selbstständiges Phänomen ist oder die Folge von der zytosolischen Kalziumkonzentration (LAZRAK und PERACCHIA, 1993; PERACCHIA et al., 1996). Beim Cx43 ist offenbar die Kalziumsensitivität ein intrinsischer Parameter, unabhängig vom Zellinhalt und der Zellumgebung. Die meisten Zelltypen haben eine intrazelluläre Kalziumkonzentration von 100nM. Verändert sich diese Konzentration im makromolaren Bereich, ist die Antwort eine physiologische Stimulierung der Zelle bzw. der

membranständigen Kanäle (PIETROBON et al., 1990). Meist ist die Bindung an Calmodulin, einem einheitlichen Kalziumbindungsprotein, z.B. an Cx32, der Ort an dem die Reaktion mit Kalzium stattfindet. Dieses ist direkt an das bestimmte Connexin gekoppelt (HERTZBERG und VAN ELDIK, 1987). Eine andere Möglichkeit ist, dass das KalziumschlieBsystem aus spezifischen Kinasen resultiert, mit anschließender Connexin-Phosphorylierung. Eine Protein-Phosphorylierung ist an Serin, Threonin und Tyrosin möglich und ein gut charakterisierter Mechanismus, bei dem extrazelluläre Signale die Funktion von Ionen-Kanälen abändern können (HILLE, 1992).

Gap junction-Kommunikation ist nicht nur essentiell für den allgemeinen Verbund von Zellen bzw. deren Kopplung, sondern auch während der embryonalen Entwicklung (BECKER und DAVIS, 1995) vor allem zur Kennzeichnung des embryonal-maternalen Signalweges, bei dem mütterliche Moleküle schnell und sicher zu dem bzw. in das embryonale Gewebe gelangen (BOWMAN und MCLAREN, 1970). Darüber hinaus müssen viele der verschiedenen Connexine schon im präimplantierten Embryo exprimiert werden, um ihre koordinierte und schnelle Absonderung bei der Implantation sicherzustellen (HOUGHTON et al., 2002). So werden z.B. Cx31 und Cx43 in der Blastozyste, dem Embryoblasten und im Trophoblasten exprimiert. Nach der Implantation ist Cx31 in den ektoplazentären Zapfen und im extraembryonalen Ektoderm nachweisbar, während Cx43 im Embryo und im viszeralen Entoderm gefunden wird (DAHL et al., 1996; GRÜMMER et al., 1996). Während der embryonalen Entwicklung sind die Connexine zudem zuständig für das Zellwachstum, die Differenzierung von Zellen und deren Gewebeformation (BENNETT et al., 1991; WARNER, 1992).

Dabei erkennt man teilweise eine selektive Kommunikation, bei der nur bestimmte Zellen miteinander in Kontakt stehen und Informationen austauschen. Dies konnte durch Farbstoffverteilungen in bestimmten Zellen beobachtet werden, bei ungefärbten Zellen der Umgebung. So konnten Kommunikationskompartimente zwischen einzelnen Zellen auch unabhängig von offensichtlichen makroskopischen Grenzen nachgewiesen werden (LO und GILULA, 1979; DE LAAT et al., 1980; WARNER und LAWRENCE, 1982; WEIR und LO, 1982; MEDA et al., 1983).

In welchem Umfang die Zellen miteinander gekoppelt sind, hängt von verschiedenen Mechanismen ab: Gentranskription, Stabilität der Messenger, translationale und

posttranslationale Modifikation und von der Ansammlung der Proteine in der Plasmamembran (SAEZ et al., 1998).

Gap Junctions werden von Hormonen, Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert (STAGG und FLETCHER, 1990; BRUZZONE et al., 1996b; SAEZ et al., 1998).

So zeigten elektronenmikroskopische Studien, dass bei dem Abbau von vollständigen Gap Junctions erst ringförmige Gap Junctions entstehen, die dann in lysosomalen, multivesikulären Körpern oder autophagosomalen Kompartimenten abgebaut werden (LARSEN und TUNG, 1978; MURRAY et al., 1981; LARSEN, 1983; MAZET et al., 1985; PELLETIER, 1988; SEVERS et al., 1989; RISLEY et al., 1992; VAUGHAN und LASATER, 1992; NAUSS et al., 1993; JORDAN et al., 2001). Falsch gefaltete Connexine werden ins Endoplasmatische Reticulum verschoben und dann von Proteosomen abgebaut. Welcher Abbauweg von der Zelle benutzt wird, ist vom Zelltyp abhängig, sowie von ihrem metabolischen und pathologischen Stadium. Nach BENNETT et al. (1991) werden Connexine in endozytotische Vesikel aufgenommen und durch Lysosomen abgebaut. Auch ein Abbau über nicht-lysosomale Mechanismen scheint möglich, z.B. über Endopeptidasen, die mit der Zellmembran assoziiert sind (BARRETT, 1992). Die Lebenszeit der Connexine wird auf ein bis fünf Stunden geschätzt, so dass sie einem regen Stoffwechsel unterliegen (SAFFITZ et al., 2000).

Viele der spezifischen Antikörper gegen Connexine binden an Gap Junctions (HERTZBERG und SKIBBENS, 1984). Aber nur wenige sind auch in der Lage, den Funktionszustand der Connexine zu ändern. Ein kleiner Teil blockiert die Kanäle und verhindert so den Molekültransfer durch die Pore (WARNER et al., 1984; HERTZBERG et al., 1985; YANCEY et al., 1989). Diese Erkenntnisse wurden teilweise für Entwicklungsstudien genutzt, in denen man nachweisen konnte, dass nichtkommunizierende embryonale Zellen meist in der Peripherie liegen und nicht mehr an der weiteren Entwicklung teilnehmen. Sie sind dadurch funktionell von den restlichen embryonalen Zellen abgetrennt (BECKER et al., 1995). Es hat sich weiterhin gezeigt, dass obwohl die Verdichtung und die Gap Junction Bildung in Embryonen eigenständige Ereignisse sind, doch zeitlich miteinander in Beziehung stehen (KIDDER et al., 1987). So ist eine gute Gap Junction gesteuerte Kommunikation wichtig für das sich verdichtende embryonale Gewebe bzw. die Organogenese und somit für die gesamte embryonale Entwicklung (BECKER und DAVIS, 1995).

3. Aufbau der Vogelhaut

Das Integument bedeckt die gesamte Körperoberfläche, wobei es vor chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen und Infektionserregern schützt. Gleichzeitig sitzen in seinen Schichten z. B. zahlreiche Nervenfasern für den Tastsinn und das Vibrationsempfinden, so dass die Haut auch das größte Sinnesorgan des Körpers darstellt (LUCAS und STETTENHEIM, 1972; SALOMON et al., 1993). Weiterhin beinhaltet sie sehr komplexe Anhangsgebilde, wie die Federn. Im Gegensatz zu den Säugetieren besitzt die allgemeine Körperdecke der Vögel keine Drüsen. Die Aufgabe der Fett- und Talgbildung übernehmen die Keratinozyten, so dass sie auch den Namen Sebokeratinozyten erhalten haben (LUCAS, 1980; WRENCH et al., 1980; WIRTH, 1993). Bei den Vögeln gibt es federlose Areale (Apteria) und Areale die Federn tragen (Pteryla). Von ihrem Grundaufbau her sind die verschiedenen Areale gleich, doch unterscheiden sie sich in der Dicke der einzelnen Schichten.

Die Haut ist aus der Epidermis als oberster Schichtung, der Dermis (Corium) und der Hypodermis (Subcutis) aufgebaut, danach folgt die Muskulatur. Die Epidermis entsteht aus dem Ektoderm, Dermis und Hypodermis aus dem Ektomesoderm.

3.1. Epidermis

Die Epidermis ist ein geschichtetes, verhorntes Plattenepithel, welches aus mehreren Schichten besteht. Von den untersten Schichten der Epidermis wandern Zellen an die Hautoberfläche, wo sie nach und nach ihre Zellorganellen verlieren und verhornen, so dass sie die abschließende Hornschicht bilden, die im Laufe der Zeit regelmäßig abgeschilfert wird (LUCAS und STETTENHEIM, 1972; FUCHS, 1990).

Die unterste Schicht der Epidermis ist das Stratum basale, welche durch die Basalmembran von der Dermis getrennt ist. Das Str. basale besteht aus kubischen, säulenförmigen Zellen mit großen, runden, basophilen Kernen (STETTENHEIM, 1974; SPEARMAN und HARDY, 1985; WIRTH, 1993) und einem ausgebildeten Cytoskelett mit Keratinfilamenten (FUCHS, 1990) im Randbereich, die lockere Bündel bilden (JUNCUEIRA und CARNEIRO, 1996). Die Zellen verfügen über alle synthetisierenden Organellen: freie Ribosomen, Polysomen für die Synthese von cytoplasmatischen Proteinen, endoplasmatisches Retikulum (ER) und einen dürftig ausgebildeten Golgi Apparat (JUNCUEIRA und CARNEIRO, 1996). Die Zytoplasmamembranen der

benachbarten Zellen sind miteinander verzahnt und werden durch Desmosomen zusammengehalten (MATOLTSY, 1969; SPEARMAN, 1980; MENON et al., 1981, 1986). Die Verbindung der Basalzellen mit der Basalmembran wird über Hemidesmosomen und feine, knöpfchenartige Fortsätze (Wurzelfüßchen) hergestellt (JANQUEIRA und CARNEIRO, 1996). Das Str. basale besteht immer nur aus einer Zelllage (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

Daraufhin folgt das Stratum intermedium mit zwei bis drei Zellschichten aus polygonalen Zellen mit runden, basophilen Kernen, die an den Enden abgeflacht sind und so spindelförmig erscheinen (LUCAS und STETTENHEIM, 1972, WIRTH, 1993). Mit diesen Zellausläufern stehen die einzelnen Zellen über Desmosomen untereinander in Kontakt und bilden so ein dreidimensionales Netzwerk aus (FRANKE et al., 1987). Die suprabasalen Spinalzellen sind postmitotisch, aber immer noch metabolisch aktiv. So bilden sie mehrere Keratine, die gleichmäßig verteilt im Plasma liegen und sich in der Peripherie über die Desmosomen verbinden (MENON et al., 1981; FUCHS, 1990). Des Weiteren laufen feine Aktinfilamente an der verdickten Plasmamembran neben den Desmosomen zusammen (KOECKE, 1968). Im Stratum intermedium zeigt sich eine hohe Syntheseaktivität. Im Randbereich der Zellen lässt sich mikroskopisch Keratohyalin erkennen. Diese Einlagerungen vergrößern sich auf ihrer Reise an die Hautoberfläche und nehmen dabei eine unregelmäßige Form an, so dass sie von MATOLSTY (1969) als Keratohyalingranula beschrieben werden, die den Prozess der Verhornung beschreiben (KÜNZEL, 1990). Es folgt das Stratum transitivum, dessen Zellen zunehmend vakuolisiert und abgeflacht sind (LUCAS und STETTENHEIM, 1972; NICKEL et al., 1992). Diese Zellen sind eine Art Skelettzellen, die neben vielen Bündeln von Keratinfilamenten zunehmend Lipidvesikel enthalten. Ein Kalzium-Einstrom, der die epidermalen Transaminasen aktiviert, macht die Zellen permeabel (FUCHS, 1990). Die Zellorganellen, wie Mitochondrien und das Endoplasmatische Retikulum degenerieren mit zunehmender Entfernung zu der Basalzellschicht (MENON et al., 1981). Es zeigen sich allerdings noch freie Ribosomen und ein glattes Endoplasmatisches Reticulum mit ausgeprägten Tubulisystem (MATOLSTY, 1969). Dieses zeigt eine Verbindung zu den Lipidtropfen, die im weiteren Verlauf immer mehr ineinander fließen und schließlich exocytotisch an den interzellulären Raum abgegeben werden.

Nach dem Stratum transitivum folgt das Stratum corneum, die Hornschicht, in der die Zellen immer flacher werden und so terminal differenzierte Keratinozyten darstellen, die nur noch durch die interzellulären Lipide zusammengehalten werden (FUCHS, 1990).

Des Weiteren schilfern diese Zellen einzeln oder in kleinen Zellverbänden ab und legen dabei das interzelluläre Fett frei, das dann auf Haut und Gefieder als sehr feiner Fettfilm verteilt wird (SPEARMAN, 1983; SPEARMAN und HARDY, 1985; WIRTH, 1993). Auffallend ist, dass in gefiederten Regionen die Hornlamellen meist sehr locker angeordnet sind (STETTENHEIM, 1974; MENON et al., 1981). Die Keratinozyten bilden verschiedene Keratine. Die der Haut bilden das weiche Alpha-Keratin und die der Feder das härtere Beta-Keratin (JANQUEIRA und CARNEIRO, 1996; PRIN und DHOULLY, 2004). Auch sind für die Entwicklung der Keratinozyten Kalzium und Retinoide wichtig. Wenn Retinol nicht vorhanden ist, sieht man in der Kultur frühzeitig morphologische und biochemische Charakteristika der terminalen Differenzierung (FUCHS und GREEN, 1981). Weiterhin konnte in der Kultur beobachtet werden, dass in Anwesenheit von wenig Retinol und einer hohen Konzentration an Kalzium zwar viele Basalzellen produziert werden, die nach ein bis zwei Zellschichten anfangen zu schuppen, wohingegen nur wenige Zellen des Stratum intermedium und des Str. transitivum gebildet werden. Die Differenzierung in der Kultur ist zudem effektiver und schneller, wenn die Epidermis ihre Nährstoffe durch Diffusion über die Dermis erhält, auch wenn diese keine natürliche ist, als wenn sie die Nährstoffe direkt aus dem Medium entnimmt (ASSELINÉAU et al., 1986). Vitamin D fördert zum Beispiel die Differenzierung der Basalzellen der Epidermis, hemmt aber weitere Zellteilungen (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996). Ein Keratinozyt bekommt seine terminale Differenzierung letztlich aus einer Konsequenz von biochemischen Stadien und deren Balance. Ob dies aktiv oder passiv geschieht, ist noch nicht endgültig geklärt (FUCHS, 1990).

3.2. Basalmembran

Die Basalmembran grenzt die Epidermis zur Dermis hin ab. So ist die Epidermis funktionell getrennt und strukturell doch verbunden. Die Epidermis ist über kleine basale Zellmembranausziehungen (Wurzelfüßchen), und meist durch Hemidesmosomen an der Basalmembran und diese wiederum an der Dermis befestigt (WIRTH, 1993; JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996). Die Basalmembran besteht aus drei Schichten. Die oberste Schicht, zur Epidermis hin, die Lamina lucida, verbindet über Hemidesmosomen die basalen Epidermiszellen mit der extrazellulären Matrix. Darunter folgt die Lamina densa, die aus einem Kollagen-IV Netzwerk besteht. Gefolgt durch die Lamina fibroreticularis, die die Basalmembran zur Dermis hin begrenzt. Von ihr gehen

Mikrofibrillen (Ankerfilamente) senkrecht von der Oberfläche in die Dermis (BAUMGÄRTNER, 1993; WIRTH, 1993; JUNQUEIRA und CORNEIRO, 1996). Die Basalmembran wird zum größten Teil vom Epithel aus synthetisiert (DODSON, 1967), ein kleiner Anteil kommt von den Fibroblasten/Fibrozyten der Dermis (SENGEL, 1976). Sie stellt eine selektive Barriere dar und besitzt Einfluss auf den Stoffwechsel benachbarter Zellen, somit auch auf die Aktivierung der Differenzierung der Epidermis.

3.3. Dermis (Corium)

Die Dermis liegt zwischen Epidermis und der Hypodermis (Subcutis) direkt der Basalmembran an. Die Dermis determiniert und stabilisiert die Epidermis. In ihr liegen die Gefäße (und die Nervenendigungen), die die Epidermis verfolgen. Sie bilden Kapillarschleifen, die bis zur Basalmembran der Epidermis laufen, aber nie in die letztere hineinragen (WIRTH, 1993).

Die Dermis zeigt bei den Vögeln eine andere Schichtung, als bei den Säugetieren, wo sie aus einem Stratum papillare und einem Stratum reticulare besteht. Bei Vögeln ist die Dermis dagegen viel differenzierter strukturiert, d.h. sie wird in ein Stratum superficiale dermi und ein Stratum profundum dermi unterteilt, welches weiter in ein Stratum compactum dermi, ein Stratum laxum dermi und ein Stratum musculo-elasticum zu differenzieren ist; es folgt eine Lamina elastica derma, die die Dermis von der Hypodermis abgrenzt (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

Die Dermis ist u. a. für die Reißfestigkeit der Haut, die Regulierung des Hautturgors, die immunologischen Abwehr und die Thermo- – und Kreislaufregulation zuständig. Des Weiteren stellt sie mit ihrer Vielzahl an Nervenendigungen und Einlagerungen von Rezeptororganen das größte Sinnesorgan des Körpers dar. In der Dermis sind auch die Hautanhangsgebilde, d. h. bei Vögeln die Federn verankert, wobei der Follikel bis in die Hypodermis reicht (MEYER und BAUMGÄRTNER, 1998). Die Federfollikel werden in der Dermis bandförmig miteinander verbunden, so dass eine Bewegung in alle Richtungen miteinander möglich ist (OSTMANN et al., 1963; JENKINSON und BLACKBURN, 1968; DORTSCHY, 2004). Auch übt die Dermis eine induktive Wirkung auf die Epidermis aus und beeinflusst so ihre Morphogenese (DODSON, 1967). Sie reguliert die epidermale Proliferation und Differenzierung. Die Verhornung der Epidermis allerdings ist ein autonomer Prozess, d.h. er ist unabhängig von der Dermis.

Der Aufbau der unterschiedlichen Schichten ist von der Körperregion abhängig und beim Vogel auch davon, ob die Haut in einem federlosen Gebiet (Apteria) oder in einem befiederten Gebiet (Pteryla) liegt. So sorgt allgemein der Anteil der an elastischen Fasern im Stratum laxum dermi für die Flexibilität der Haut (STETTENHEIM, 1974; SPEARMAN und HARDY, 1985). MEYER et al. (1989) konnten zeigen, dass das Stratum laxum in befiederter Haut wenig ausgeprägt ist, mit wenig Kapillaren, die sich auf die Federfollikel konzentrieren und dazwischen nur vereinzelt zu finden sind. Auch wenn die Haut in federlosen Gebieten insgesamt dicker ist als in befiederten Arealen.

3.4. Hypodermis (Subcutis)

Die Hypodermis besteht aus einem Stratum superficiale und einem Stratum profundum, darunter folgen die Fascie und die Skelettmuskulatur. Die Hypodermis enthält überwiegend lockeres Bindegewebe mit eingelagerten Fettgewebsläppchen (PASS, 1989). Dazwischen liegen Fasern von quergestreifter Skelettmuskulatur, die am Skelett oder an dessen Muskeln befestigt sind und die Hautspannung regulieren (SALOMON et al., 1993) und als Verschiebeschicht dient.

3.5. Apteria - Aufbau der federlosen Areale

Der Aufbau der federlosen Haut wird am Beispiel der postauriculären Apteria beschrieben, die den anderen federlosen Arealen ähnelt (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). Das Stratum germinativum besteht meist aus drei Zellschichten. Das Stratum superficiale dermi umfasst 1/3 der gesamten Dermis, wobei das Stratum profundum 2/3 der Dermis einnimmt und die Blutgefäße, Nerven, glatten Muskelfasern und das Fettgewebe beinhaltet (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). Die Nervenfasern umgeben vor allem im Stratum laxum die Blutgefäße und werden von glatter Muskulatur begleitet. Je nach Region zeigt diese Schicht eine unterschiedliche Dicke. Insgesamt haben die Vögel weniger hypodermales Fettgewebe als die Säugetiere, weil die Dunenfedern für die Thermoregulation zuständig sind und den Körper sehr gut isolieren (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). Die Hypodermis besteht beim Hühnchen vor allem aus kollagenen Fasern, Blutgefäßen sowie Nervenfasern und ist je nach Alter des Tieres und Körperregion unterschiedlich dick.

Weitere federlose Areale unterscheiden sich nur in wenigen histologischen Merkmalen von der postauriculären Aptería. So weisen die federlosen Areale an der Brustregion insgesamt viele glatte Muskelzellen mit elastischen Sehnen auf. Diese werden auch als federlose Muskeln bezeichnet und bilden die Hautmuskulatur. Die Epidermis besitzt ein deutliches Stratum basale und ein mehrschichtiges Str. intermedium. Die Dermis zeigt im Stratum superficiale eher dichtes Gewebe, welches im Stratum profundum von lockerem Gewebe abgelöst wird, in dem sich Kapillaren, kollagene Fasern und Fettgewebe erkennen lassen. Das Stratum laxum mit Hautmuskelzellen, Blutgefäßen und Nervenzellen ist eher locker aufgebaut. Das Stratum musculo-elasticum bildet keine einheitliche Schicht (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). Die Hypodermis ist in diesem Bereich dicker als die Dermis. In der lateralen Beckenregion ist die Haut wie in der Brustregion aufgebaut, mit Hautmuskelfasern im Stratum laxum. In der federlosen lateralen Halsregion liegen keine Muskelfasern, auch nicht um die Gefäße, so dass das Stratum laxum aus lockerem Bindegewebe besteht und die letzte Schicht mit größeren Arterien und Venen vor der Dermis bildet. In der lateralen schwanzwärtigen Aptería zeigen sich wieder Hautmuskelzellen mit einem auffällig breitem Stratum superficiale bei einer schmalen Hypodermis (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

3.6. Pteryla – Aufbau der befiederten Areale

In der befiederten Haut, der Pteryla, liegen die Federfollikel in der Dermis (LUCAS und STETTENHEIM, 1972) und reichen teilweise bis zur Hypodermis hinab (MEYER et al., 1989). Die Follikel sind von Muskulatur, Fettgewebe, lockerem Bindegewebe, Blutkapillaren und größeren Blutgefäßen sowie Nervengewebe umgeben; dort sieht man weiter eine dicke Lamina elastica. Direkt unterhalb der Epidermis liegt eine dichte Schicht aus kollagenen Faserbündeln und darunter die Federfollikel. Weiterhin verlaufen die Kapillaren in der Dermis parallel zur Epidermis und bilden so eine Grenzlinie zwischen dem Stratum superficiale und dem Stratum profundum. Dabei liegen diese beiden Schichten in der Nähe der Federfollikel so dicht aneinander, dass sie als eine Schicht erscheinen und dort als Stratum laxum bezeichnet werden. Umgeben wird der Federfollikel aus lockerem Bindegewebe mit vielen Fettzellen (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

Die Follikel der Fadenfedern haben keine eigenen Federmuskeln, liegen oft im Stratum superficiale dermi und sind von kompaktem Bindegewebe umgeben. Gleichzeitig liegen

sehr viele Kapillaren und kleine Ansammlungen von plurivesikulären Fettzellen um die Fadenfedern herum.

Die Federmuskulatur an sich setzt über Sehnen am Federfollikel an und ist umgeben von Kapillaren und kleineren Gefäßen. Das Gewebe zwischen den einzelnen Muskelbündeln ist ausgefüllt mit uni- und plurivesikulären Fettzellen, so dass sich die Federn über die Follikel in alle Richtungen frei bewegen können (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

3.7. Embryonale Entwicklung

Nach LUCAS und STETTENHEIM (1972) ist ab dem Stadium 20 HH, etwa dem 2. Entwicklungstag, am Hühnerembryo eine „Epidermis“ erkennbar, die den Embryo gegen die umgebenden Gewebe abgrenzt. Diese embryonale Epidermis geht direkt aus dem Ektoderm hervor und besteht zu diesem Zeitpunkt aus einer Schicht, dem Periderm. Zu diesem Zeitpunkt sind hier noch Mitosen erkennbar. Ab dem Stadium 21 HH, etwa dem 3,5. Entwicklungstag, bildet sich langsam eine Basalmembran, die das Periderm von dem darunterliegenden Dermatome abgrenzt, welches aus Ektomesoderm gebildet wird (WIRTH, 1993). In der weiteren Entwicklung zeigen sich in der Silberimprägnierung ab dem Stadium 24 – 25 HH, etwa dem 4. Entwicklungstag, argyrophile Granula in der Basalschicht mit einer schwarz versilberten äußeren Schicht. D.h., jetzt bildet sich langsam eine weitere epidermale Schicht, das Stratum basale. In den nächsten Stadien sind zunehmend Mitosen im Stratum basale sichtbar (WIRTH, 1993). Die ersten Kollagenfasern in der sich differenzierenden Dermis sind ab dem Stadium 29 – 30 HH nachweisbar, wobei bis zum Stadium 39 HH ausschließlich Kollagen Typ I gebildet wird. Erst ab dem Stadium 40 – 41 HH kann auch Kollagen Typ III nachgewiesen werden (WIRTH, 1993). Ab dem Stadium 31 – 32 HH, dem 7. Entwicklungstag, sind in der Hypodermis Myoblasten sichtbar. Weiterhin bilden sich Bindegewebspapillen, die an der Haut als Zeichen der Federanlagen hervortreten (WIRTH, 1993). Die Epidermis bleibt weiterhin zweischichtig und zeigt ab dem Stadium 36 HH, dem 10. Entwicklungstag, eine deutliche Abflachung. Ab diesem Stadium ist im Bereich des Flügels erstmals eine Dreischichtigkeit der Epidermis erkennbar, d.h., sie besteht aus einem Stratum basale mit vielen Mitosen, einem Stratum intermedium und dem Periderm. In der darunterliegenden Dermis sind Blutgefäße und Nervenplexi sichtbar. Die Hypodermis zeigt viele Fibroblasten, Faserelemente und kleinere

Blutgefäßen (WIRTH, 1993). Ab dem Stadium 38 HH, dem 12. Entwicklungstag, sind in der dreischichtigen Epidermis in allen Epidermiszellen argyrophile Granula zu erkennen. Nun ist auch im gesamten Embryo eine vollständige Basalschicht nachweisbar (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). In der Dermis zeigt sich ein Gefäßplexus aus Kapillaren ohne eindeutiges Endothel. Im Gegensatz dazu ist bei den kleinen Gefäßen in der Hypodermis ein Endothel erkennbar. Ab dem Stadium 39 HH, etwa dem 13. Entwicklungstag, zeigt sich eine erhöhte Mitoserate im Stratum basale und die Anzahl der Schichten im Stratum intermedium nehmen zu. Langsam beginnt die Verhornung des Epithels, wobei das Periderm abschilfert und nun vom Stratum corneum ersetzt wird. Die Federanlagen sinken langsam in die Dermis ab und es zeigen sich erste Myoblasten für die späteren Federmuskeln. Dieses ist ein fließender Übergang und nicht in allen Hautarealen zur gleichen Zeit sichtbar (WIRTH, 1993). Im Stadium 40/41 HH, etwa dem 14./15. Entwicklungstag, wird die Epidermis drei- bis vierschichtig. Das Stratum intermedium nimmt an Schichten zu und es bilden sich spindelförmige Zellen, wie im Stratum intermedium der Säugetierepidermis. Erstmals erscheinen in der Dermis Kollagenfasern des Kollagen Typs III. Auch treten die ersten elastischen Fasern auf, v.a. im Stratum compactum, beginnend in der dorsalen Haut; dazu entsteht jetzt das Stratum laxum. Die Federmuskulatur, die den Federfollikel umgibt, wird langsam deutlicher und kann lichtmikroskopisch gut erkannt werden (WIRTH, 1993). Im Stadium 42 HH, dem 16. Entwicklungstag, sind in der Epidermis in manchen Regionen bis zu fünf Schichten nachweisbar. Das Periderm wird nun fast überall vom Stratum corneum abgelöst. Bis zum Stadium 45 HH, etwa dem 19. Entwicklungstag, weist die Epidermis bis zu vier Schichten auf, wobei das Stratum corneum weitere zwei bis drei abschilfernde Zelllagen zeigt. Gleichzeitig mit den Hautschichten entwickeln sich die Federfollikel, wobei die Dermis eine induktive Wirkung auf die Epidermis offenbart und dadurch deren Differenzierung beeinflusst (FLAXMAN, 1972).

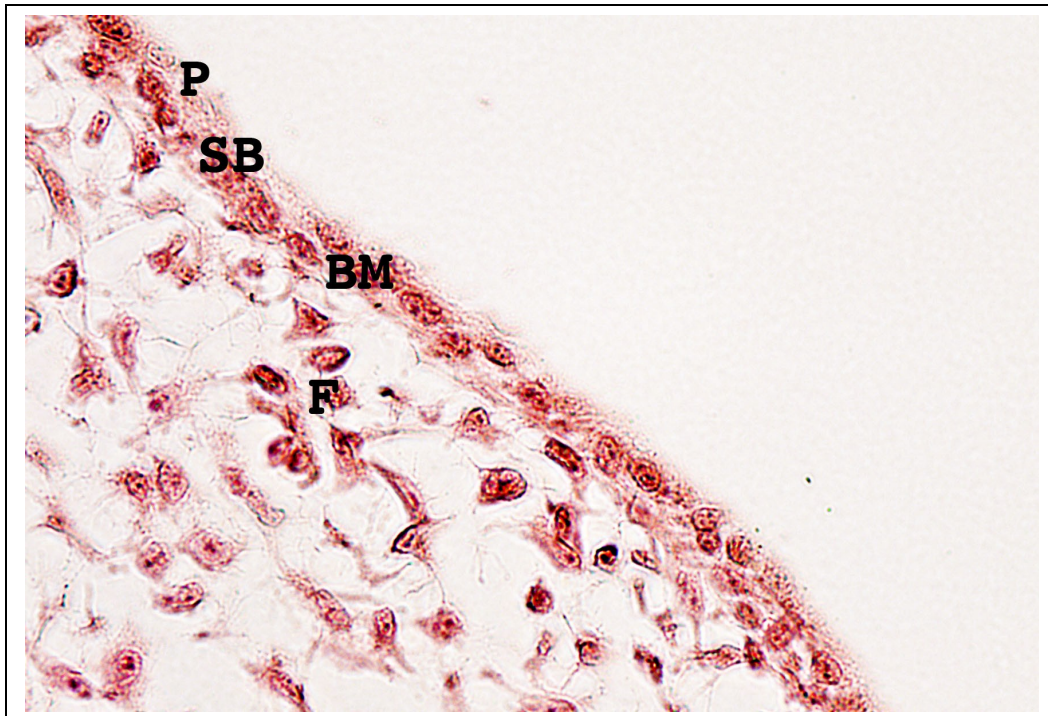


Fig.4: HE, Hühnerembryo 5. Entwicklungstag, Stadium 26/27 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Periderm über dem Stratum basale, welches der Basalmembran aufliegt.

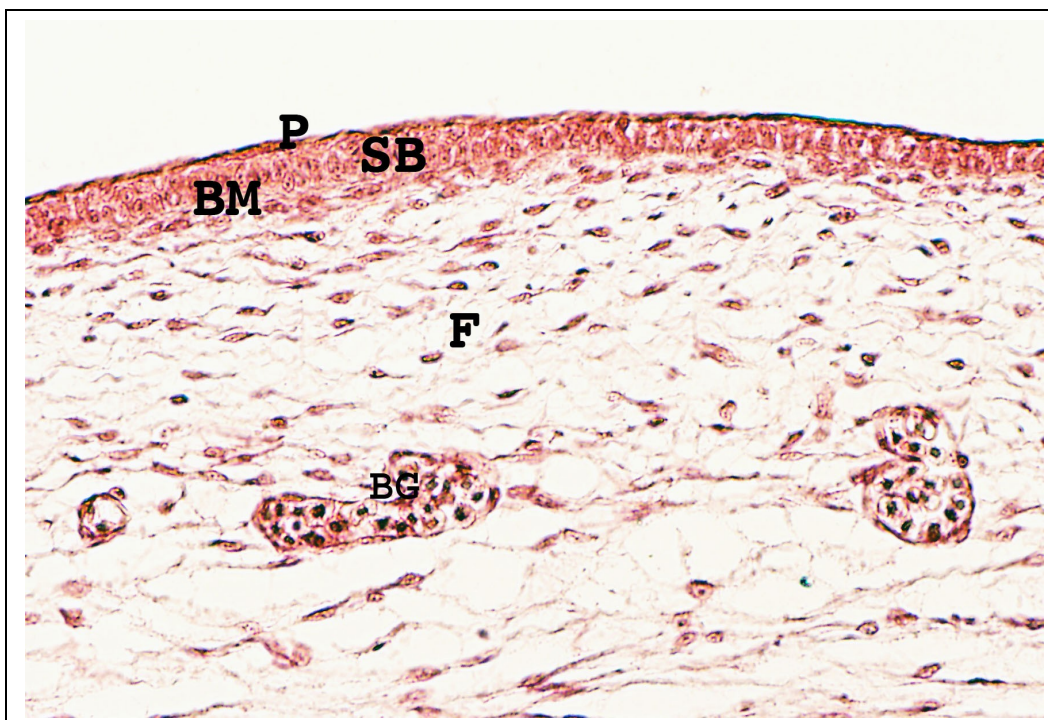


Fig.5: HE, Hühnerembryo 10. Entwicklungstag, Stadium 36 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Stratum basale mit hochprismatischen Zellen, der Basalmembran aufliegend, Periderm mit flachen Zellen. In der Dermis bilden sich Blutgefäße.

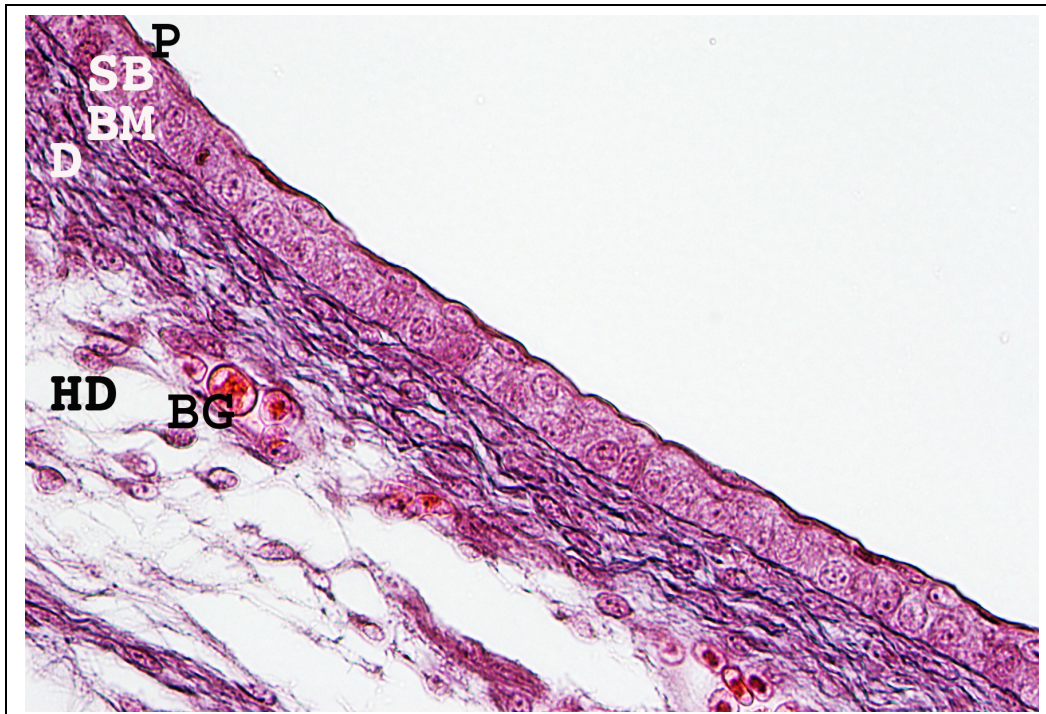


Fig.6: HE, Hühnerembryo 14. Entwicklungstag, Stadium 40 HH, Objektivergrößerung 40fach; Mehrschichtige Epidermis bestehend aus dem Periderm, einem frühen Stratum intermedium und einem Stratum basale. Die Dermis und Hypodermis sind klar trennbar, an deren Grenze sich vermehrt Blutgefäße zeigen.

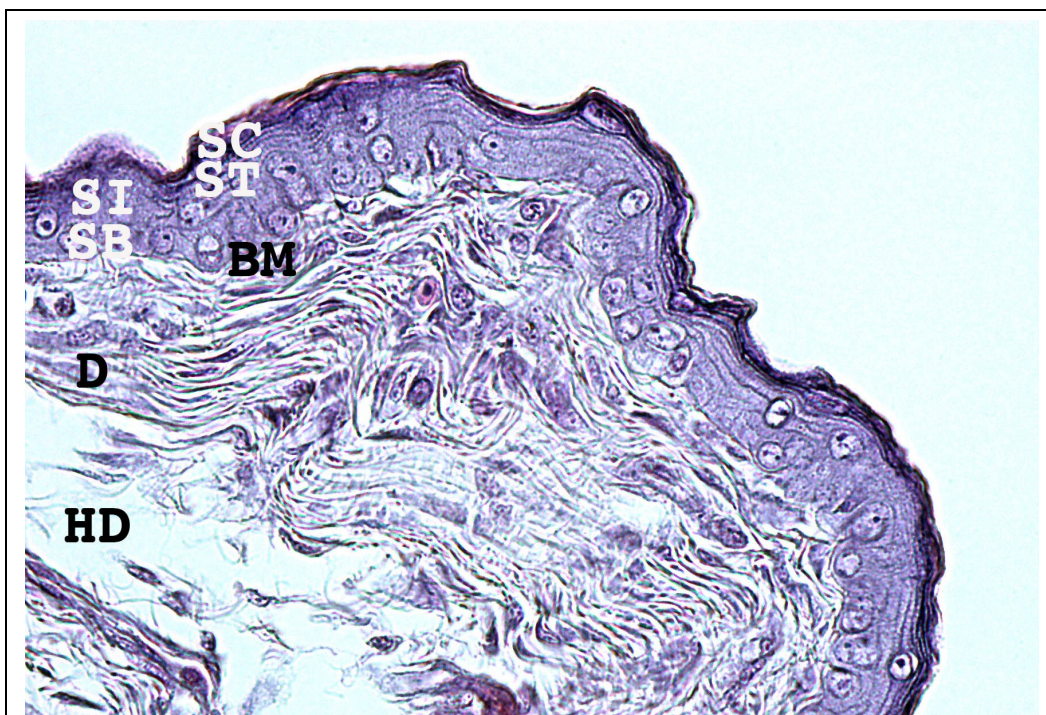


Fig.7: HE, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivergrößerung 40fach; Es zeigt sich in der Epidermis jetzt eindeutig ein Stratum corneum und ein Stratum transitivum.

4. Feder und Federfollikel

Das Gefieder spielt eine Schlüsselrolle im Temperaturhaushalt der Vögel, der Biomechanik des Fliegens und der Kommunikation mit Artgenossen und anderen Tieren. Je nach Spezies besitzt ein Vogel 20000 bis 80000 Federn. Es gibt verschiedene Federtypen, die bei jedem Vogel vorhanden sind und sich im unterschiedlichen Alter der Tiere auch unterscheiden können (STARCK, 1989).

So kommen Nestflüchter, zu denen auch unsere Haushühner gehören, mit vollständigem Federkleid zur Welt. Dieses Gefieder ist das so genannte Schlüpfungsgefieder (Neoptil). Es zeigt den Aufbau von Dunenfedern mit ringförmiger Schaftanlage (Spule) und von ihr ausgehende Barbae (Rami) und Barbulae (Radii). Sie stellen allerdings die erste Generation der Konturfedern dar, die sich dunig entwickeln. Die echten Dunen sind embryonal in eigenen Keimen angelegt und beteiligen sich nie an der Bildung des Neoptilgefieders. Die Aufgabe des Neoptilgefieders ähnelt derjenigen der adulten Konturfedern. So sind sie für die Thermoregulation, den Verdunstungsschutz und je nach Farbgebung für die Tarnung zuständig (STARCK, 1989).

Zur Unterscheidung der verschiedenen Federtypen führten LUCAS und STETTENHEIM (1972) eine Nomenklatur ein, die von SAWYER et al. (1986) übernommen wurde:

1. Konturfedern: Sie bestehen aus den Deckfedern (Tectrices), den Schwungfedern (Remiges), auch Flugfedern genannt, und den Steuerfedern (Rectrices), oft auch als Schwanzfedern bezeichnet (YU et al., 2004). Die Konturfedern sitzen an der gesamten Oberfläche und dienen durch ihre Färbung der Tarnung und intraspezifischen Kommunikation (v.a. die am distalen Rumpfteil), dem Schutz vor Feuchtigkeit, der Thermoregulation (v.a. die am proximalen Anteil des Vogelkörpers) und verleihen dem Körper die aerodynamische Form.

Die Schwungfedern und Steuerfedern dienen dem Flug und der Lokomotion. Bei manchen Vogelarten auch der Kommunikation und zeigen so die Stimmung des Vogels an. Die Konturfedern sind bilateral symmetrisch. Nach WIDELITZ et al. (2003) besitzen auch einige Flugfedern diesen bilateral symmetrischen Aufbau.

2. Dunenfedern: Als erste Federgeneration finden sich bei den meisten Vögeln so genannte Nestlingsdunen, die noch keine spezifische Struktur zur Bildung einer Fahne aufweisen. Die Hauptaufgaben sind diejenige der Thermoregulation und der Tarnung, wobei die Aerodynamik noch im Hintergrund steht. Die Nestlingsdunen entwickeln sich allerdings aus Deckfederanlagen (YU et al., 2004).

Die Dunen der adulten Vögel weisen einen kurzen bis sehr kurzen Schaft auf und sitzen mit ihren Federästen oft direkt der Federspule auf. Ihr Aufbau ist radial symmetrisch. Die Dunen werden fast vollständig von Deckfedern eingeschlossen und bilden eine isolierende Luftschicht und sind somit für die Thermoregulation zuständig. Weitere Dunenfedern sind die Bürzeldunen und bei einigen Arten die Puderdunen. Dabei wird an den Bürzeldunen vom Schnabel ein fettiges Sekret aufgenommen und über das gesamte Gefieder verteilt. Die Puderdunen zeigen keine Federstruktur mehr. Sie generieren in ihrer Gesamtheit und sorgen so für eine kontinuierliche Produktion von Federpuder.

3. Halbdunen: Der Aufbau ähnelt dem der Dunen, doch ist ihr Schaft deutlich länger als die längsten Federäste. Vermutlich dienen auch sie der Thermoregulation.

4. Borstenfedern: Sie entstehen aus einem meist sehr kurzem, breiten Schaft und dienen je nach Ort ihres Vorkommens im Bereich der Augen und Nasenöffnung als Schutz vor Verschmutzungen. Bei manchen Arten in der Nähe des Schnabels auch als Tastorgan.

5. Fadenfedern: Sie sind immer mit Konturfedern assoziiert und besitzen einen langen, dünnen Schaft, der an seinem terminalen Ende einige kurze Federäste trägt. Sie scheinen als Rezeptoren für feine Vibrationen und somit der Erkennung der Stellung von benachbarten Konturfedern zu dienen.

Einige kategorisieren die Federn nach ihrem Zeitpunkt der Entstehung. So gibt es die „Kükenfedern“, neoptile Federn, auch als „Schlüpfungsgefieder“ bezeichnet, die vollständig während der embryonalen Entwicklung gebildet werden und mit denen die Küken schlüpfen. Danach folgt das „Jugendgefieder“, auch als teleoptile Federn bezeichnet. Diese werden nach der ersten Phase der Federn gebildet (DHOUAILLY, 1970; YU et al., 2004). Andere Autoren unterteilen die ersten drei Generationen der

Federn in das Geburts-, Jugend- und erstes Basisgefieder (HUMPHREY und PARKES, 1959).

4.1. Aufbau der Feder

Der Aufbau der Feder wird am Beispiel einer Konturfeder beschrieben. Sie besteht aus einem langen und festen Federkiel (Scapus), der einem distal befiederten Schaft (Rachis) und eine proximale, unbefiederte Spule (Calamus) besitzt. An der Spule gibt es zwei Öffnungen, einen oberen Nabel (Umbilicus superior), der Schaft und Spule trennt, und einen unteren Nabel (Umbilicus inferior), der die Spule am unteren Ende zum Follikel hin abgrenzt. Die Spule ist eine verhornte Röhre, die im Laufe der Entwicklung mit mehreren Hornlamellen verschlossen wird. Diese Hornlamellen werden in ihrer Gesamtheit als Federseele bezeichnet und entstehen beim Zurückziehen der Pulpa während des Austritts der Feder und deren Wachstum (LUCAS und STETTENEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993). Durch den unteren Nabel treten während der Entwicklung die Pulpagesäße ein, die zur Versorgung der sich entwickelnden Feder notwendig sind und an deren Formgebung teilhaben. Die Pulpa ist bei einer ausgewachsenen Feder vertrocknet. So stellen ausgewachsene Federn tote Gebilde dar, die einmal jährlich gewechselt werden müssen, da sie dann abgenutzt sind. Der Schaft wird während der Entwicklung aus verschiedenen Zellen aufgebaut, einmal aus den Zellen, die im Mark sitzen, mit großem Lumen, die nur an den Zellwänden keratinisiert werden und aus Zellen, die vollständig verhornen und das Mark wie eine Rinde (Cortex) umschließen.

Der Schaft trägt die Federfahne (Vexillum), die sich aus zahlreichen Federästen (Barbae) und den daran ansetzenden Federstrahlen (Barbulae) zusammensetzt. Die Federstrahlen werden in Bogenstrahlen (Barbulae proximales) und Hakenstrahlen (Barbulae distales) unterteilt (LUCAS und STETTENEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993). An den Hakenstrahlen sitzen feine Häkchen, die sich mit den Bogenstrahlen des benachbarten Federastes verbinden und somit die notwendige Steifheit und Festigkeit der Federfahne herstellen. Dabei weisen die Bogenstrahlen eine längere Basis auf als die Hakenstrahlen und haben einen verdickten dorsal umgebogenen Rand (Arcus dorsalis), in den die Haken der Hakenstrahlen einhaken können (LUCAS und STETTENEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993).

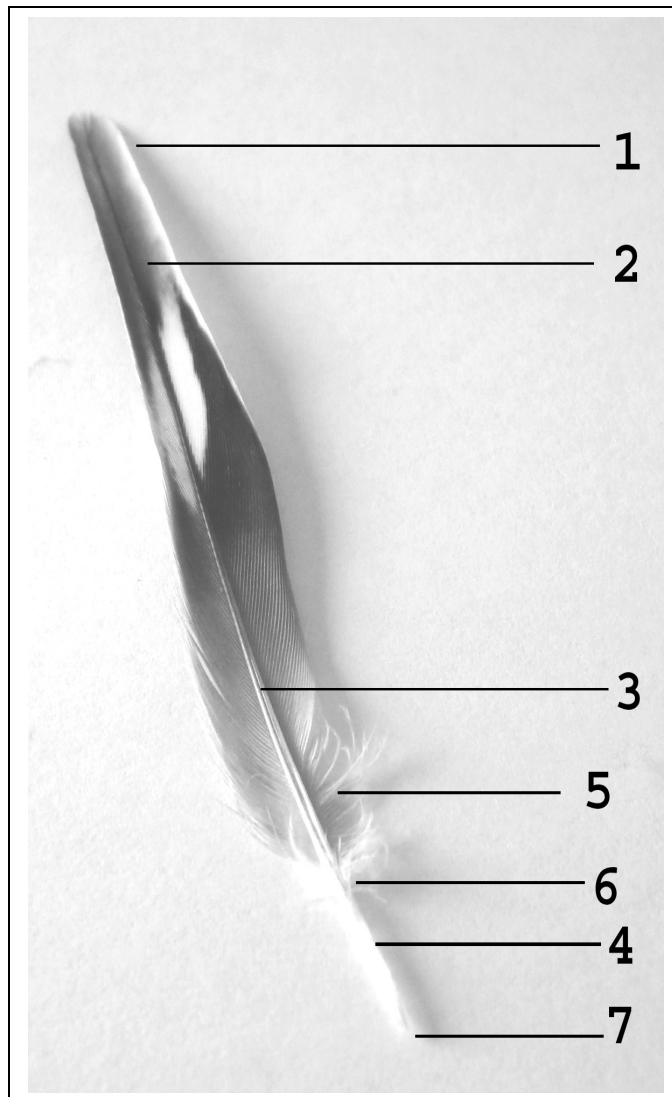


Fig.8: Konturfeder eines Wellensittichs (*Melopsittacus undulatus*)
 1 Federäste, 2 Innenfahne, 3 Federschaft, 4 Federspule, 5 freie, dunige Federäste, 6 oberer Nabel, 7 unterer Nabel

Dieser Teil der Feder wird auch als *Pars pennacea* bezeichnet. An der Basis des Schaftes wiederum sitzen an einigen Konturfedern beiderseits daunenartige Federäste (*Pars plumacea*).

Die Art der Feder ist determiniert über die Kombination der Anzahl, Größe und Form des Schaftes, sowie der Federäste und Federstrahlen mit unterschiedlichen Stufen der Symmetrie und Asymmetrie. Die Länge der Feder ist abhängig von der Länge des Schaftes und der Länge der anagenen Phase im Federzyklus (WIDELITZ et al., 2003).

Der Typ der Feder ist durch das Aussehen bzw. der Form der Federäste und der Charakteristika der Federstrahlen vorgegeben.

Im Querschnitt ist der Federast mit seinen verschiedenen Strukturen am besten zu erkennen und zu erklären. So erscheinen die Federäste im Querschnitt oval bis lanzettförmig. Man kann einen proximalen und einen distalen Sims erkennen, wobei der distale Sims weiter nach dorsal verschoben ist, als der proximale. In diesen Gebieten setzen die Federstrahlen an einer relativ breiten Ansatzfläche an, auch sorgen sie auf diese Weise für eine Überlappung der einzelnen Federäste und geben so weitere Stabilität. Außerdem werden ein dorsaler und ventraler Kamm (Crista dorsalis und ventralis) von den Federästen gebildet. Wenn dabei der ventrale Kamm stark verlängert ist und sich soweit umbiegt, dass er eine horizontale Lage zum Federast aufweist, wird er auch als Tegmen bezeichnet. Diese Tegmen sind vor allem an Flugfedern zu finden, die einem hohen Druck auf ihrer Unterseite ausgesetzt sind, denn sie verhindern durch ihre spezielle Form einen Luftstrom zwischen den Federästen (LUCAS und STETTENHEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993).

Die Basis der Federstrahlen stellt eine Verbindung zum Federast her und besteht aus schmalen, hohen Zellen. An diese Basis schließt die Pennula an, die aus langgezogenen, abgerundet erscheinenden Zellen besteht. An deren Übergang sieht man häufig Fortsätze in Form von dorsalen Stacheln oder Zähnchen (Stilus dorsalis) und ventralen Zähnen (Dens ventralis). An den Wänden der Pennula können sich auch Fortsätze bilden, die dorsalen und ventralen Cilien (Cilium dorsale und ventrale). Zu den Cilium ventrale gehören auch die Haken (Hamuli), die am Ende der Hakenstrahlen sitzen (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

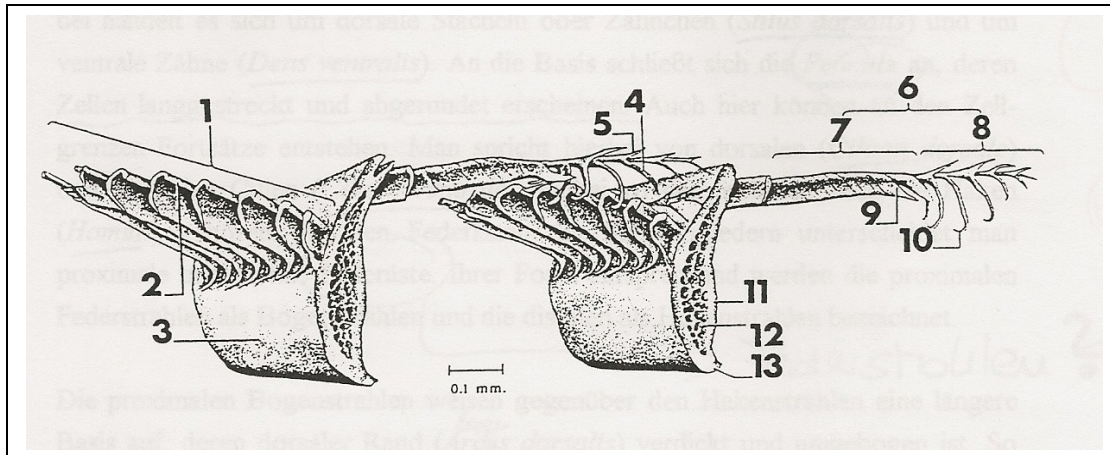


Fig.9: Querschnitt durch zwei Federäste einer Konturfeder eines Hühnchens mit Darstellung des Ineinanderhakens der Federäste miteinander 1: proximaler Federstrahl, 2: dorsaler Rand, 3: Rahmen des Federastes, 4: ventrales Cilium, 5: dorsales Cilium, 6: distaler Federstrahl, 7: Basis, 8: Pennula, 9: ventraler Zahn, 10: Haken, 11: Rinde, 12: Mark, 13: ventraler Kamm (nach LUCAS und STETTENHEIM, 1972)

4.2. Aufbau der Federfollikel

Die Feder ist über den Federfollikel (Folliculus) in der Haut verankert. Er stellt eine sackförmige Einstülpung dar, die je nach Lage der Feder bis teilweise zu den Knochen reichen kann. Vor allem bei den Schwung- und Steuerfedern im Flügel- und Schwanzbereich sind solche tiefen Verankerungen zu finden (OSTMANN et al., 1963; LUCAS und STETTENHEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993). Die Feder sitzt mit der Spule im Follikel und wird von der epidermalen Follikelwand umgeben. Diese Follikelwand wird aus einem Stratum corneum und einem Stratum basale aufgebaut, welches aus flachen, kubischen Zellen mit großen Zellkernen besteht und von der dermalen Follikelwand durch eine schmale Basalmembran abgetrennt ist. Zwischen dem verhornten Stratum corneum und der Federspule ist ein kleiner Spalt vorhanden, der mit dünnen Hornfilamenten ausgefüllt und als Follikelhöhle bezeichnet wird. Die dermale Follikelwand ist etwa doppelt so dick wie die epidermale und wird aus zirkulär angeordneten Kollagenfasern gebildet. Darunter findet sich eine Schicht von longitudinal angeordneten elastischen Fasern, die parallel zur Federlängsachse ausgerichtet sind. Zwischen den Kollagenfaser liegen verstreut ringförmig angeordnete elastische Fasern, die wieder von einer Reihe longitudinaler Fasern abgelöst wird. An der Basis des Follikels sind die dermalen Zellen abgeflacht und umgeben die Basis wie eine Wand. In der Follikelwand liegen Nervenfasern als Ausläufer afferenter, somatischer Nerven. Im Gegensatz zum Haarfollikel der Säugetiere organisieren sie

sich erkennbar, aber nicht zu einem Plexus (OSTMANN et al., 1963; LUCAS und STETTENHEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993). An der basalen Follikelwand liegen Nervenfasern direkt neben den umgebenen Kapillaren zusammen. Die medial vorhandenen Nervenfasern gehören zu den afferenten Nerven der Federmuskulatur. Die apikal gelegenen Nervenfasern gehören zu den somatischen Nerven der oberen Hautschicht. Weiterhin gibt es freie Nervenendigungen sowohl in den epidermalen als auch den dermalen Anteilen der Follikelwand. Vor allem die Fadenfedern sind besonders stark innerviert, ausgehend von dem Nervenstrang, der von den Konturfedern kommt, in deren unmittelbarer Nachbarschaft sie sich befinden (LUCAS und STETTENHEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993).

Weiterhin ist die Papille des Federfollikels von einem Netzwerk aus vasomotorischen Fasern umgeben, das mit den Ganglien des autonomen Nervensystems in Verbindung steht. Dabei wird die zentrale Arterie von efferenten und teilweise sensorischen Fasern gesäumt, die mit der Pulpa in die Höhe wachsen und so die Feder versorgen. In der Dermis liegen mehrere freie sensorische Nervenendigungen, die von einer mehrschichtigen Kapsel umgeben sind, und so den Vater-Paccinischen-Körperchen der Säuger ähneln und wie diese auf Druck und Vibrationen reagieren. Viele solcher Herbst'schen Korpuskel kann man v. a. in der Nähe der Fadenfedern nachweisen (OSTMANN et al., 1963; LUCAS und STETTENHEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993).

Die Gefäßeinsprossung der Federfollikel und der Federn kommt aus den Blutgefäßen der Skelettmuskulatur. Die Versorgung des gesamten Follikels geschieht über zwei Arterien und zwei Venen, die sich direkt gegenüber liegen und ein feines Kapillarnetz bilden (LUCAS und STETTENHEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993).

Ein Netzwerk von Muskelfasern liegt in der Dermis und umgibt jeden Federfollikel. Die Muskeln werden als Erector, Depressor und Retractor bezeichnet (SAXOD, 1978; SAXOD et al., 1996). Diese Muskelfasern sind dermalen Herkunft und aus glatter Muskulatur, wobei sie drei bis vier benachbarte Follikel miteinander verbinden. Da die Follikel etwas nach kaudal geneigt sind, setzt der erste Typ der Muskelfasern an der Basis des einen Follikels an und zieht von da aus zum apikalen Anteil eines anterior gelegenen zweiten Follikels. Er wirkt somit als Depressor, der bei Kontraktion die Federn an die Körperoberfläche zieht. Der zweite Typ der Muskelfasern zieht genau in die Gegenrichtung, also von der Basis des anterior gelegenen Follikels zum apikalen Rand des ersten Follikels. Bei Kontraktion stellt er die Federn auf und wirkt somit als Erector. Der dritte Muskelfasertyp verbindet die Federn in gleicher Höhe und zieht die

Federn bei Kontraktion dicht aneinander, wirkt so als Retraktor. Gesteuert werden diese Muskelfasern durch das autonome Nervensystem. An den Schwung- und Steuerfedern lässt sich auch quergestreifte Muskulatur nachweisen, die die Follikel mit den Skelettelementen verbindet und eine Verbindung zum ZNS und somit zur Willkürmotorik aufweist, um das Fliegen und die Lokomotorik zu ermöglichen (OSTMANN et al., 1963; LUCAS und STETTENHEIM, 1972; BAUMGÄRTNER, 1993).

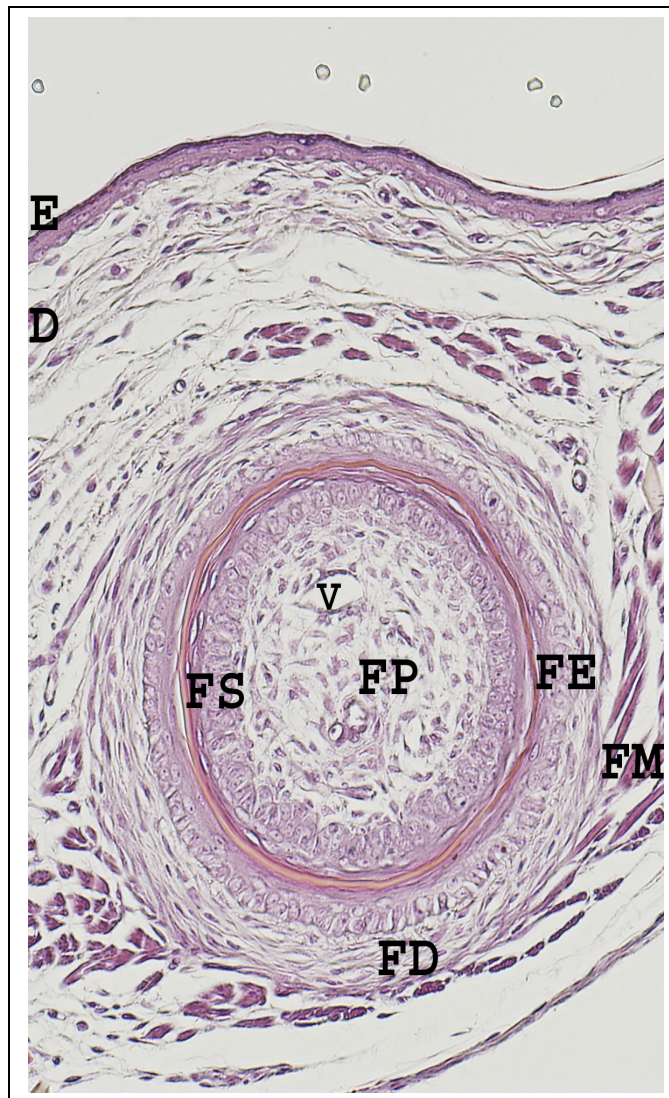


Fig.10: HE, Hühnerembryo 19. ET, Stadium 45 HH, Querschnitt Federfollikel, 20fache Vergrößerung; Epidermis (E), Dermis (D), Federpulpa (FP) mit zentralen Blutgefäßen (Vene (V)), Federspule (FS), Follikelepithel (FE), Follikeldermis (FD), Anteile der Federmuskulatur (FM)

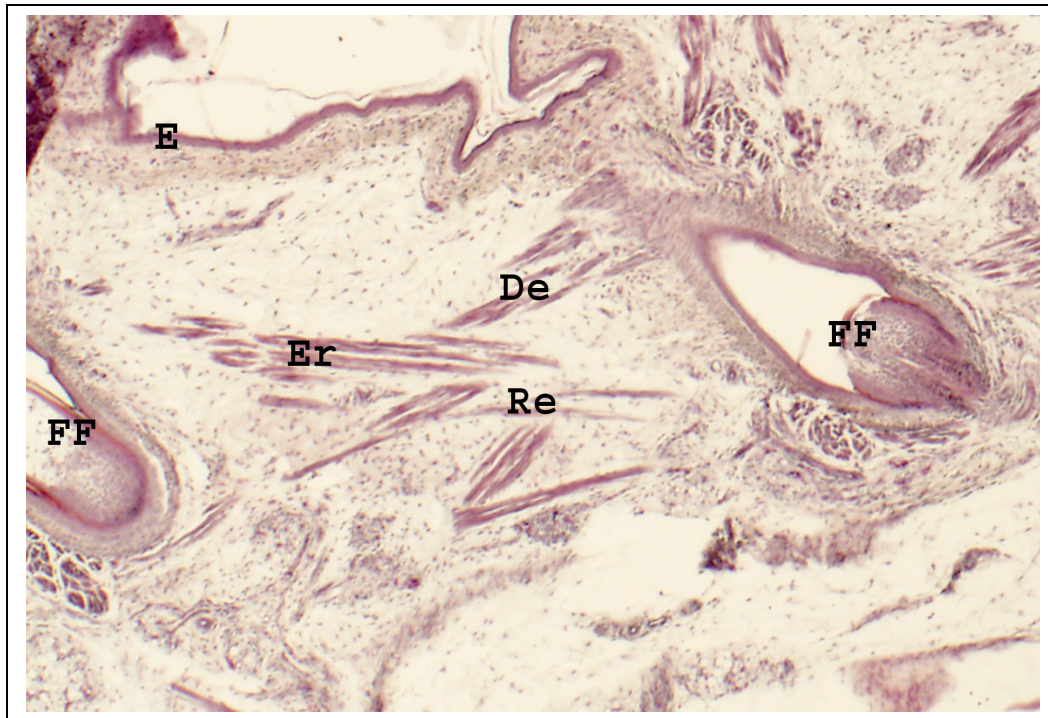


Fig.11: HE, Hühnerembryo 19. ET, Stadium 45 HH, 2,5fache Vergrößerung; Anordnung der Federmuskulatur Epidermis (E), Federfollikel (FF), Fasern von Depressor (De), Erector (Er) und Retractor (Re)

4.3. Embryonale Entwicklung von Feder und Federfollikel

Komplexe Interaktionen zwischen Dermis und Epidermis spielen für die Induktion der Federfollikel und somit der Federbildung eine ausschlaggebende Rolle. Sie beziehen viele Zelltypen von beiden Komponenten mit ein. Auch hängt es von bestimmten Körperregionen ab, ob die Haut mit Federn besetzt wird oder federlos bleibt (SENGEL et al., 1969). Somit ist die Federhaut genetisch darauf programmiert, Federn zu konstruieren (PRIN und DHOUAILLY, 2004). Wichtig für die Entwicklung von Federn ist ein kontinuierlicher Dialog zwischen Dermis und Epidermis mit zwei Hauptkomponenten, der dermalen Induktion und der gegebenen epidermalen Kompetenz (DHOUAILLY, 1973; 1977; PRIN und DHOUAILLY, 2004). Als erstes formen Ektomesodermzellen (Fibroblasten) eine dichte Schicht in der Dermis unter dem Federfeld. Dann formen diese mesenchymalen Zellen in der dichten Dermis periodisch arrangierte dermale Kondensationen. Zusammen mit der epidermalen Plakode stellen sie den Ursprung der Feder in den dafür vorgesehenen Hautarealen dar (JIANG et al., 2004).

Alle späteren Federn werden embryonal extra angelegt und können in dieser Phase nur durch den Zeitpunkt der Anlage, aber nicht durch ihre Morphologie unterschieden werden. Als erstes entstehen die Konturfedern in den Federfluren; GOLLIEZ (1966) bezeichnet dies als erste Federfolge. Die zweite Federfolge ist die Anlage der Dunen, gefolgt von der dritten Federfolge, der Anlage der Fadenfedern, die im direkten Lagebezug zu den Konturfedern stehen (GERBER, 1939; BROMAN, 1941; GOLLIEZ, 1966).

In den Ursprungsgebieten werden in den unterschiedlichen Zellen auch verschiedene Signal-, Wachstums- und Zelladhäsionsmoleküle gebildet, die nicht nur abhängig von den jeweiligen Zellen sind, sondern auch von den Zonen der Ursprungsfeder, Federknospen, Zwischenknospen und den Verknüpfungszonen (CHUONG et al., 1990; JIANG und CHUONG, 1992). So ist z.B. BMP (Bone morphogenetic protein) ein Inhibitor der Federknospe und wird in der epidermalen Plakode und den Zellen der kondensierten Dermis exprimiert (NORAMLY und MORGAN, 1998). Follastatin ist ein Antagonist des BMP und wird innerhalb der Federknospe exprimiert. Es kann so ab einem bestimmten Schwellenwert das BMP direkt innerhalb der Federknospe inhibieren und damit die Federformation zulassen (PATEL et al., 1999). Ein weiterer Antagonist für das BMP ist das DRM/GREMLIN. Seine Hauptexpression findet während der Entwicklung der Haut statt und unterscheidet sich signifikant von Follastatin. Es zeigt ein dynamisches Expressionsmuster während der Gliedmaßen-, Bronchialbögen-, Dermatom- und Federknospenentwicklung (MERINO et al., 1999; BARDOT et al., 2001; OHYAMA et al., 2001; BARDOT et al., 2004) und ist als Aktivator der Letzteren anzusehen. Eine Expression der endogenen DRM scheint unter der Kontrolle einer Rückkopplungsschleife zu stehen, die unter Induktion von BMP beeinflusst wird (BARDOT et al., 2004). Da DRM nie in Apterien (federlosen Hautarealen) nachgewiesen wird, könnte es als ein wichtiger dermaler Faktor während der Federgebietsbildung, Primordia-Formation und Knospen-Morphogenese definiert werden (BARDOT et al., 2004).

Die dichte Dermis induziert die Entwicklung der epidermalen Plakode als erstes histologisch erkennbares Element der Federknospe (BARDOT et al., 2004). Die epidermale Plakode wiederum signalisiert der Dermis, weitere Zellen zu aggregieren (JIANG et al., 1999), und eine dermale Kondensation zu formen, die sich ihre eigenen induzierenden Eigenschaften aneignet.

So besteht der Federfollikel aus sich invaginierender Epidermis, die die Pulpa umschließt und von einem Federfilament, dem Zylinder, umgeben ist (YU et al., 2004). Während dieser Morphogenese werden zuerst symmetrische Knospen und danach asymmetrische Knospen geformt (WIDELITZ et al., 2003). So bildet die epidermale Feder mit dem mesodermalen Versorgungs- und Verankerungsapparat unterschiedlichen Ursprungs eine funktionelle Einheit.

Nach LUCAS und STETTENHEIM (1972) besitzt das Hühnchen 20 Federflächen, wobei sich die Federn der verschiedenen Flächen in ihrer Orientierung und Organisation unterscheiden (MAYERSON und FALLON, 1985). Manche dieser Unterschiede zwischen den Federflächen, den so genannten Trakt, haben ihren Ursprung in den verschiedenen Zellen ihres Mesenchyms. Da embryonale epitheliale Stammzellen pluripotent sind, können sie sich je nach Signal des darunterliegenden Mesenchyms zu einer Federfläche (Pteryla) oder einer federlosen Region (Apteria) entwickeln. Sie können aber auch zu verschiedenen Federflächen werden.

Der Beginn der Federentwicklung startet im kaudalen Abschnitt der Rückenflur (Pteryla dorsalis) ab dem Stadium 30 HH, dann folgt die Pteryla femoralis (32-34 HH), die Pteryla interscapularis (33 -36 HH), die Pteryla scapularis (33-34 HH) bis in den Stadien 36/37 HH alle Federanlagen ausgebildet sind (HAMBURGER und HAMILTON, 1951; LUCAS und STETTENHEIM, 1972; STARCK, 1989). So startet die Entwicklung in der dorsalen Mittellinie, schreitet bilateral in sechseckig verpackten Feldern fort und erstreckt sich dann erst an der abdominalen Seite des Körpers.

Aufgrund des unterschiedlichen Beginns der Federentwicklung kommen in den verschiedenen Regionen unterschiedlich weit entwickelte Federanlagen vor (GERBER, 1939). Dabei stellen die Konturfedern die am jeweils weitesten fortgeschrittenen Federn dar. Erst danach folgen die Dunenfederanlagen, die aber aufgrund der weiteren Entwicklung der Konturfedern nicht mehr bei jeder Vogelart von außen beobachtet werden können (STARCK, 1989).

Die Entwicklung der Federn kann in drei verschiedene Phasen eingeteilt werden, der frühen, der mittleren und der späten Embryonalentwicklung. Die frühe Phase umfasst die Stadien 29 bis 34 HH, die mittlere Phase die Stadien 35 bis 37 HH und die späte Phase die Stadien 38 bis 41 HH (BAUMGÄRTNER, 1993). Manche Autoren unterscheiden auch nur eine frühe und eine späte Phase (YU et al., 2004). In der frühen Phase spielen Interaktionen zwischen Dermis und Epidermis eine ausschlaggebende Rolle für die Induktion der Federfollikel. In der späten Phase zeigt die Epidermis der

Follikelwand einen dreischichtigen Aufbau, der aus einem Stratum basale, einem Stratum intermedium und einem Stratum corneum besteht. Auch die Federanlage und das Federfilament sind dreischichtig konstruiert. Die äußerste Schicht, die Federscheide, zersetzt sich am Ende der Federentwicklung, damit die Feder austreten kann (YU et al., 2004).

STARCK (1989) stellte fest, dass diese Entwicklung bis zum Stadium 39/40 HH, bei dem das Grundgerüst der Feder entwickelt ist und die Anlage der Federmuskulatur sichtbar wird, bei allen Vogelarten gleich ist. Auch erkennt man eine Angleichung der Entwicklung von Federn und Federfollikeln in allen Körperregionen im Stadium 42 HH (BAUMGÄRTNER, 1993).

Die frühe Embryonalentwicklung ab Tag 6 ½ (Stadium 30 HH) beginnt mit einer Verdichtung des mesodermalen Mesenchyms durch Zusammenlagerung der Fibroblasten aufgrund Zellwanderung und Zellvermehrung. Dabei erkennt man zusätzlich eine flache Vorwölbung der Epidermis. Nach LUCAS und STETTENHEIM (1972) ist die Kondensation der Mesenchymzellen in einer Schicht der Dermis mit der Formung von Clustern in der Epidermis schon ab dem 5. Entwicklungstag (Stadium 28 HH) sichtbar. Die Epidermis ist weiterhin zweischichtig aufgebaut, dem Stratum basale, das durch die Basalmembran von dem darunter liegendem Mesenchym getrennt ist, und dem Periderm, das die Oberfläche nach außen hin abschließt. Im Stratum basale liegen hochprismatische Zellen mit einem großen Zellkern und großen interzellulären Räumen. Das Periderm wird aus abgeflachten, relativ großflächigen Zellen gebildet. Nach BAUMGÄRTNER (1993) sieht man in diesem Stadium eine Streckung der Basalzellen und eine Ausdehnung des Mesenchyms. Des Weiteren lassen sich von der Basalmembran ausgehende Fasern erkennen, die in die Tiefe ziehen und als Ankerfilamente (KALMAN et al., 1967; LUCAS und STETTENHEIM, 1972) bezeichnet werden. Auch Melanoblasten vermehren sich in der Epidermis und Dermis (LUCAS und STETTENHEIM, 1972; YU et al., 2004).

Die entstehende subepidermale Mesenchymverdichtung scheint der Induktor der Federanlage zu sein. Sie regt zur Zellteilung im Stratum basale an und führt so zusätzlich zu einer Vielschichtigkeit der Epidermis. Diese nun auch leicht höckrige Epidermis wirkt wieder auf die Mesenchymverdichtung ein und trägt somit zur Lagebestimmung der Federanlage bei (KOECKE und KÜHN, 1962). Unter dieser Verdichtung vermehren sich die Kapillaren. Die Zellvermehrung im Stratum basale und

einem entstehenden Stratum intermedium führt zu einer Erhöhung der Epidermis über das ursprüngliche Niveau hinaus, d.h. eine Epidermisplakode entsteht (BAUMGÄRTNER, 1993; MEYER und BAUMGÄRTNER, 1998). So werden ab diesem Stadium in der Haut die verschiedenen Federflächen gebildet.

Essentiell für die Federentwicklung ist Beta-Catenin. In Hühnerhaut konnte gezeigt werden, dass auch mit ektopischer Expression von Beta-Catenin in federlosen Arealen neue Federknospen induziert werden können (NORAMLY et al., 1999). Der ausschlaggebende Weg für die Bildung der Federplakode ist, dass die Zelladhäsion bei einer bestimmten Dichte der adhäsiven Zellen eine bestimmte Schwelle übersteigt. Dann werden aus den homogenen Mesenchymzellen viele kleine Zellaggregate geformt (10 bis 25 Zellen groß). Diese Mikroaggregate kondensieren zu größeren Aggregaten. Allerdings ist diese Zellaggregation reversibel und die größeren Aggregate sind instabil. Werden die Aggregate allerdings noch größer, beginnt der Aktivator-Inhibitor-Mechanismus zu wirken und die dermale Kondensation wird gefestigt. Durch die Kondensation der Mesenchymzellen wird nun eine „First-dermal-message“ an die Epidermis gesandt, sich zu vermehren und eine Plakode entsteht (HARDY, 1968; CHUONG et al., 1996).

Ab Tag 7 (Stadium 30-32 HH) wird die Federknospe geformt, die im Laufe der Entwicklung in ein Federfilament übergeht (PRIN und DHOUAILLY, 2004). Erst wächst das Stratum basale in der Randzone der Federpapille, die durch weitere Zellvermehrung direkt aus der Federplakode entsteht und dadurch das ehemalige Epidermisniveau immer weiter überragt, nach unten in das Mesenchym hinein. So bildet sich eine doppelagige Epithelfalte, die eine zentrale Mesenchympapille (Pulpa) umgibt, die aus der Dermis entsteht (BAUMGÄRTNER, 1993). Das Periderm bleibt weiterhin oberflächlich. Die starke Zellvermehrung des Mesenchyms schiebt die Papille nach außen, wobei Kapillaren einwachsen. Dieses wird als spätes Papillenstadium oder frühes Fadenstadium bezeichnet. Im Querschnitt kann man gut die kreisförmige Federanlage mit dem zentralen Pulpamesenchym und der umgebenen doppelagigen Epithelfalte erkennen. Die innere Epithellage ist durch die Basalmembran gegen die Pulpa abgegrenzt und entspricht der Anlage des Federepithels. Die äußere Epithellage ist durch die Basalmembran gegen das Mesenchym abgegrenzt und bildet so die Anlage des Follikelepithels. Auch startet zu dieser Zeit die Synthese von Melanin in den Melanoblasten. Bald nach der Melaninproduktion in den nun ausdifferenzierten

Melanozyten beginnt der Transfer des Melanins zu den Keratinozyten (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

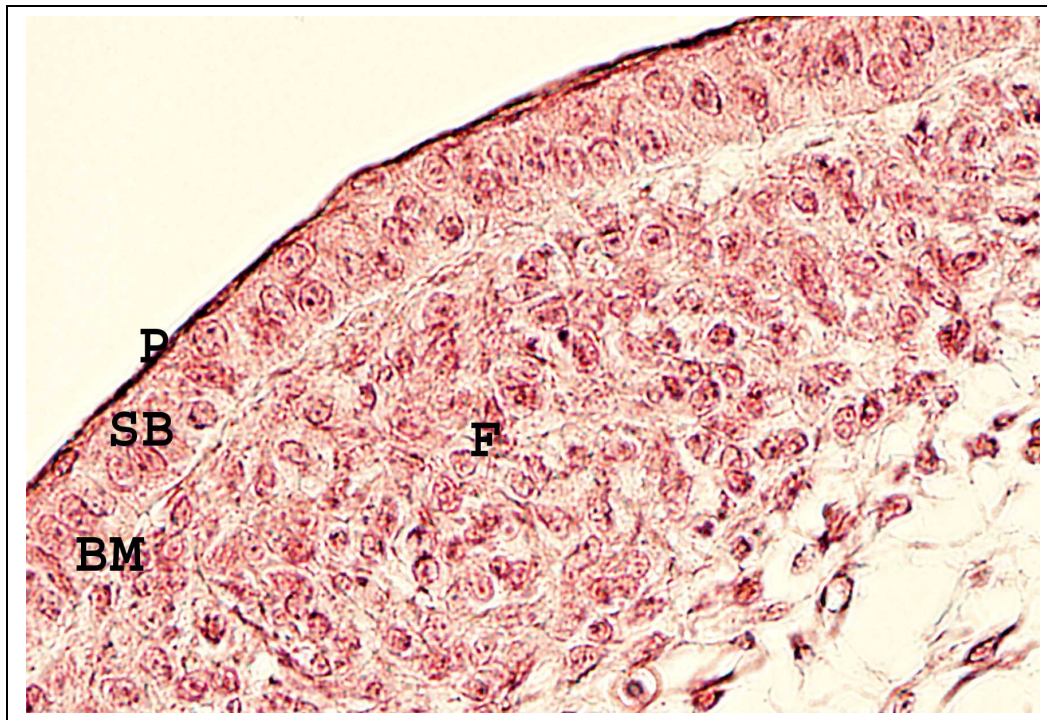


Fig.12: HE, Hühnerembryo 7. Entwicklungstag, Stadium 30-32 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Federanlage mit Vermehrung der Fibroblasten unter einem zweischichtigen Epithel

Im Hühnerembryo sind ab Tag 9 (Stadium 35 HH) verschiedene Stufen der Federknospen zu erkennen, beginnend an der dorsalen Körperoberfläche mit den einer frühen Entwicklung der Federknospe, danach folgt die laterale Körperfläche, bis zur abdominellen Körperfläche, mit einem späten Beginn der Federknospen-Differenzierung (SENGEL et al., 1969; CHUONG und EDELMAN, 1985). In der Epidermis, einschließlich der Federplakode, lässt sich L-CAM (liver cell adhesion molecule) nachweisen, in den Nerven und der dermalen Kondensationszone nahe der Federplakoden dagegen N-CAM (neural cell adhesion molecule) (CHUONG und EDELMAN, 1985).

Während Tag 9 bis 11 (Stadium 35 – 37 HH), zeigt sich eine Neigung der Federanlage zur Hautoberfläche hin. In der Epidermis ist eine verstärkte Zellproliferation sichtbar, wobei im Stratum basale viele hochprismatische Zellen mit apikal gelegenen Kernen auffallen. Das Stratum intermedium bildet eine geschlossene Schicht und das Periderm ist stark abgeflacht. Die Dicke und Komplexität der Dermis nehmen von basal nach

apikal hin kontinuierlich ab. Es sind primäre Epidermisleisten erkennbar, die durch eine radiäre Basalmembran voneinander getrennt sind und somit als Primärleisten bezeichnet werden. Das Periderm wird mit zwei Schichten des Stratum intermedium zur späteren Federscheide (BAUMGÄRTNER, 1993). Die Federanlage ist lichtmikroskopisch als ein langes, fadenförmiges Gebilde sichtbar, deren Basis weiter in die Dermis gesenkt wird. Das Zentralgefäß wächst bis an die Spitze der Federanlage. Im weiteren Verlauf differenzieren sich dermale Mesenchymstränge zur Anlage für die spätere Federmuskulatur.

Im basalen Bereich der Federanlage zeigt sich das Federepithel in der Dermis, dessen äußerste Lage abgeflachte, verhornende Zellen aufweist und so zur Federscheide wird, die ohne sichtbare Grenze in die Follikelscheide übergeht, die vom Follikelepithel gebildet wird. In beiden Epithelien ist ein hochaktives Stratum basale deutlich. Ein Stratum corneum mit verhornenden Lagen wird langsam sichtbar. Es bildet sich ein kleiner Spalt zwischen den beiden verhornenden Schichten, der als Follikelspalt bezeichnet wird. Im apikalen Bereich der Federanlage liegen Stratum basale und Stratum intermedium in radiär und längs angeordneten Epithelleisten, die von außen septenartig in den Pulpaquerschnitt hineinragen. Die zentralwärts liegenden Zellen vergrößern sich und werden so zur Ramogensäule. Sie entstehen aus dem Stratum intermedium der Epidermis und bilden als so genannte „barb ridges“ die Vorläufer der späteren Federäste (Barbae). Zwischen den einzelnen barb ridges liegt die einschichtige Basalmembran als Randplatte, die von den Grenzplatten umgeben wird und so ein Barb-Septum bilden (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). Von da aus zeigen sich zwei Reihen, die astförmig von dieser Säule abgehen, die Radiogensäulen, als Anlage für die späteren Radii (Barbulae). Die am Rand liegenden Zellen jeder Epithelleiste haben eine lang gestreckte Form und entsprechen der Marginalleiste, wodurch sie gegen die benachbarten Leisten abgetrennt werden. Die zentrale einzellige Trennschicht zwischen den Radiogensäulen ist die Axialplatte. Die Marginal- und Axialplatten verhornen im Laufe der Entwicklung und zerfallen zu Federpuder, wobei sie die Rami (Barbae) und Radii (Barbulae) freilegen. Die Intermediumzellen bilden mit dem Periderm und dem Federepithel eine mehrschichtige Zellreihe mit spindelförmigen Zellen, die die Vorläufer des späteren Federschaftes (Calamus) darstellen. Melanozyten, die von der Neuralleiste einwandern, geben Melaningranula über lange Zellfortsätze in die Radiogensäulen ab. Der Pigmentierungsvorgang wird durch die Verhornung beendet (STARCK, 1989).

Das Grundgerüst der Feder ist gebildet, und zeigt nun eine zentrale mesodermale Federpulpa mit einem Zentralgefäß. Nach innen ist diese Struktur von dem eigentlichen epidermalen Federepithel umgeben und nach außen vom Follikelepithel abgeschlossen (STARCK, 1989). Diese Schritte der Federentwicklung sind bei allen Vogelarten gleich. Bis zum Schlupf ist bei den Nestflüchtern die Ausbildung der hornigen Dunenfedern abgeschlossen, wobei die Neoptildune bis zum Schlupf von einer hornigen Federscheide umschlossen bleibt, die nach den Schlupf schnell abschilfert (STARCK, 1989).

Ab dem Tag 10 (Stadium 36 HH), wächst die basale Schicht des Federkeimes schneller an der oberen Knospe der epidermalen Region und beginnt eine Reihe von „ridges“ parallel zur langen Achse des Federkeimes zu formen. Die Epidermis, die die Federknospe umgibt, startet ihre Invagination in die Dermis und bildet so eine äußere Schicht, die Follikelscheide und eine innere Schicht, mit Intermediär- und Basallage (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). Im Hühnchen sind sie sternförmig symmetrisch angeordnet (DHOUAILLY, 1970; HARRIES et al., 2002). Der Federkamm dehnt sich gegen die Basis der langen Federknospe aus (PRUM, 1999).

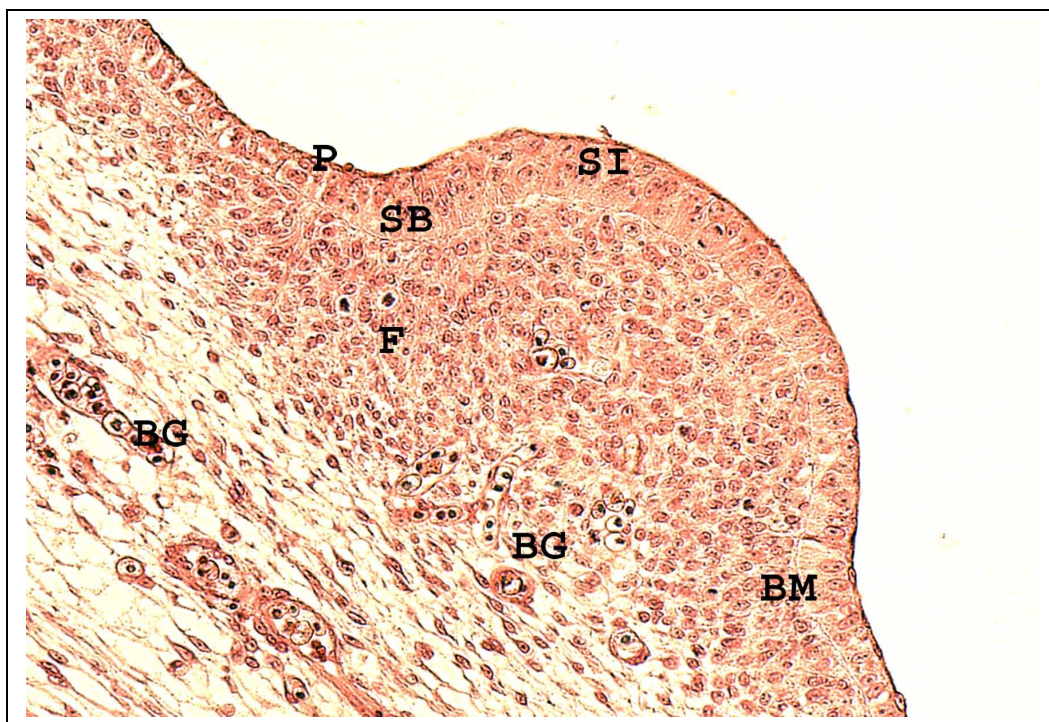


Fig.13: HE, Hühnerembryo 10. Entwicklungstag, Stadium 36 HH, Objektivergrößerung 20fach; Federplakode mit Bildung eines Stratum intermedium in diesem Bereich und Blutgefäßen

Ab dem Tag 11 (Stadium 37 HH) invaginiert die Epidermis rund um die Federbasis in die Dermis. Die Knospe verlängert sich, sprosst weiter in die Dermis ein, formt eine tiefe, lange Narbe und wird so zum Follikel (WIDELITZ et al., 2003). In dieser Zeit startet der Follikel den Prozess der Zelldifferenzierung. Diese Prozesse entwickeln sich parallel mit der Exprimierung von Alpha-Keratin (MEYER und BAUMGÄRTNER, 1998). Auch die Pulpa wird mit ihrer zentralen Arterie von vielen Mesenchymzellen gebildet. Des Weiteren lassen sich in den Pulpazellen mit mesenchymalen Ursprung verschiedene Proteine nachweisen, wie z. B. Fibronektin (CHUONG und EDELMAN, 1985). Weiterhin fangen Nervensprossen an, in die Pulpa einzusprossen. Die umfangreichste sensorische Nervenarkade tritt zu diesem Zeitpunkt der Follikelbildung auf (PAYS et al., 1997). Sie bildet ringförmige Strukturen unter der Haut aus, wobei die Ringe die Follikel umkreisen (SAXOD, 1978; SAXOD et al., 1995).

In den Tagen 11 bis 14 (Stadium 38 – 40 HH) bilden sich drei radiäre Zelleisten aus dem Stratum intermedium, die seitlich vom Stratum basale abgegrenzt werden. Es handelt sich um zwei Radiogenstränge mit abgeflachten Zellen und großen, längsovalen Kernen, die durch eine Radiogenplatte getrennt werden. Diese ist durch kleine Zellen mit runden Zellkernen gekennzeichnet. Das Stratum basale bildet im zentralen Teil das Pulpaepithel aus, und an den oberen Zellreihen die Randplatten. Der epidermale Anteil der Follikelwand senkt sich immer weiter in die Dermis ein. An der Umschlagstelle löst sich der Aufbau der Schichtung auf und ist nicht mehr eindeutig zuzuordnen. Der Entwicklungsgrad nimmt von basal nach apikal stetig zu. Zentral werden die Radiogenstränge durch dicht gepackte Zellen verbunden, die sich als Ramogensäulen einordnen lassen. Diese Ramogensäulen besitzen zentral große Medullazellen, die peripher von stark abgeflachten Cortexzellen umgeben sind. Die Intermediumzellen bilden mit dem Periderm und dem Federepithel eine mehrschichtige Zelllage mit spindelförmigen Zellen, die als Vorläufer des Federschaftes (Calamus) angesehen werden (BAUMGÄRTNER, 1993).

Am Tag 13 (Stadium 39 HH) fangen die Federfilamente an, sich zu differenzieren (MATULIONIS, 1970; LUCAS und STETTENHEIM, 1972; CHUONG und WIDELITZ, 1999; MADERSON und ALIBARDI, 2000). In der Nähe des Federkeimes zeigen sich drei longitudinale Platten, wobei eine einschichtige marginale Platte am Rande jedes Federstrahles liegt. Dann folgen zwei „Barbulae“-Schichten mit jeweils zwei Säulen, die

die „Federstrahlen“ bilden, in deren Mitte die axiale Platte liegt. Zwei marginale Platten von zwei benachbarten Federstrahlen bilden das Federstrahlenseptum (YU et al., 2004). Diese Zwischenschicht gibt der Feder ihre Stabilität über die Bildung von „Barbae“ und „Barbulae“, die nun Beta-Keratin exprimieren. Die beiden umgebenen Schichten exprimieren dagegen noch Alpha-Keratin und degenerieren beim Schlüpfen (MEYER und BAUMGÄRTNER, 1998; PRIN und DHOUAILLY, 2004). Ab diesem Zeitpunkt sind die ersten Anzeichen der finalen Keratinisierung im Schaft und den Vorläuferanteilen der späteren Federstrahlen nachweisbar (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

In den Tagen 13 bis 14 (Stadium 39 bis 40 HH) versenkt sich die Federanlage immer weiter in die Dermis und nimmt eine röhrenförmige Gestalt an. Im basalen Bereich des späteren Federfollikels zeigt sich Anschluss an eine weitere Ansammlung von verdichtetem Mesenchym mit langgestreckten Zellen. Diese Struktur ist die Anlage der Federmuskulatur, wobei die Differenzierung zu den Muskelzellen erst später erfolgt. Der Differenzierungsgrad der glatten Muskulatur ist lichtmikroskopisch allerdings nicht gut darstellbar. Das Grundgerüst der Feder ist gebildet, mit einer zentralen mesenchymalen Pulpa mit einem Zentralgefäß. Nach innen ist diese Struktur von dem eigentlichen epidermalen Federepithel umgeben und wird nach außen vom Follikelepithel abgeschlossen (STARCK, 1989).

Am Tag 14 (Stadium 40 HH) zeigt sich eine Wachstumszone für „Barbulae cells“ (Federstrahlencellen), die aus Keratinozyten gebildet werden. Eine Follikelhöhle erkennt man nicht mehr, weil der Federkeim komplett mit Follikeln gefüllt ist. Die Grenze zwischen Follikel und Scheide liegt so dicht aneinander, dass sie einschichtig erscheint; sie wird aus 10 bis 15 Federkämmen geformt. In diesen Follikeln liegen epidermale Stammzellen, die die nächste Federgeneration garantieren (PRIN und DHOUAILLY, 2004; YU et al., 2004).

In den Tagen 14 bis 18 (Stadium 40 bis 44 HH) verdickt sich die Epithelschicht und die Zellen fangen an sich zu differenzieren. Das zylinderartige Federfilament zeigt eine basale Schicht, die die Pulpa auskleidet, eine intermediäre Schicht und eine äußere Schicht, die die Federscheide bildet.

Ab dem Tag 16 (Stadium 42 HH) erzeugen die Zellen der Wachstumszonen einen Rahmen an der Spitze jedes Federastes. Das Pulpaepithel ist fortlaufend verbunden, als ein konzentrischer Epithelring, der die Pulpa auskleidet. Die Federfahne entsteht aus diesem Rahmen und aus einer Seite der Federstrahlen. Die Rahmen organisieren sich gegen die anteriore Seite mit dem Federfilament und verschmelzen an ihren proximalen Enden. Die zweiseitig symmetrische Feder hat den Großteil ihrer Zellen auf der anterioren Seite, die vermutlich zum Schaft werden. Während eine geringere Anzahl auf der gegenüberliegenden Seite zum Afterschaft (Hyparachis) wird (Yu et al., 2004). Dieser Schaftkamm ähnelt in der Keratinisierung und Struktur dem Rahmen mit Rinde und Mark. Dabei besteht die Rinde am Rand aus abgeflachten Zellen und im Mark aus großen Zellen mit kleinen Nuclei. Diese Zellen verlieren im Laufe der Federentwicklung ihr Zytoplasma und geben der Feder ihre starke Struktur. Die Federstrahlen reifen immer weiter und nehmen abhängig von ihrem Federtyp unterschiedliche Charakteristika an (YU et al., 2004). Die Säulen der Strahlenfedern verlängern sich, differenzieren sich weiter aus und vereinen sich zum „Rahmen“, der aus einer Basis und dem angrenzenden Penulum besteht. Die zwei Reihen der Federstrahlen werden als distaler und proximaler Federstrahl bezeichnet. Dabei ist der distale Federstrahl derjenige, der nahe am Schaft liegt (YU et al., 2004). Die Zellen in der Dermis und Hypodermis um die Follikel herum differenzieren sich ebenfalls zusehends weiter aus. In der Dermis bilden sich unter anderem mehr Fibrozyten und Kapillaren. Darunter folgt eine Schicht von lockerem Kollagengewebe mit Arterien, Venen, Federmuskulatur und Nervenfasern, wobei spezielle sensorische Körperchen noch nicht sichtbar sind. In der Hypodermis entsteht viel multivesikuläres Fettgewebe (LUCAS und STETTENHEIM, 1972); auch beginnt die Keratinisierung aller Federäste.

Ab dem Tag 19 (Stadium 45 HH) ist die Differenzierung und Keratinisierung der Kükenfeder (Nestlingsdune) beendet. Sie beginnt an der Spitze der Feder (HAAKE et al., 1984), wobei die Kerne und Zellgrenzen in den unterschiedlichen Anteilen der Feder verschwinden. Die Federscheide ist außen dünner als in tieferen Gebieten und besitzt ein bis zwei trennende Schichten, die nach dem Schlupf abplatzen und die Feder freilegen. Im Inneren des Federfilamentes liegt die Basalschicht der Epidermis an der inneren Oberfläche des Federkammes und bildet dort eine Röhre um die Pulpa und wird somit zum Pulpaepithel. Dieses wiederum teilt sich in eine innere und eine äußere Schicht. Während die Spitze der äußeren Schicht keratinisiert wird, bildet die innere

Schicht eine Serie von Pulpakappen in periodischen Intervallen, die sich anlagern und so einem Bambusrohr ähneln, wodurch die Federscheide stabilisiert wird (YU et al., 2004). Die Pulpa ist durch mehrere Federsegmente begrenzt. Mit der Degeneration und Absorption wird am distalen Ende des Schaftes begonnen (YU et al., 2004). An der Basis des Federstrahls sind die Zellen eher abgeflacht und an der Peripherie oval bis rund. Die Zellen der marginalen und axialen Platte sind nahezu verschwunden, wobei die Röhre aus basalen Epidermiszellen, die die Pulpa umranden immer dicker wird. Die Rinde jedes Rahmens ist verdickt und die Zellen der Medulla werden im Laufe der Differenzierung kernlos. Der proximale Anteil der Feder beendet die Entwicklung des Federkammes und signalisiert den distalen Anteil des Flügels. Die abschließende Proliferation von Zellen in der epidermalen Manschette bildet eine homogen-differenzierte Röhre, die zum Calamus wird. Wenn der Bildungsprozess der Feder nahezu abgeschlossen ist, wird die Pulpa komplett resorbiert und die endgültigen Pulpakappen formieren sich oberhalb der dermalen Papille. Diese Kappen verschließen den unteren Nabel (Umbilicus inferior) am Ende des Calamus (YU et al., 2004).

Kurz nach dem Schlüpfen des Kükens platzt die Spitze jeder Federscheide ab, die Federäste tauchen auf und dringen durch die Scheide nach außen. Die äußere, mehr peripher gelegene Seite des Rahmens und der Schäfte formen die dorsale Oberfläche der Flügel. Die vorher basal gelegene Zellschicht bildet den ventralen Teil des Flügels.

Um die einzelnen Follikel entwickeln elastische Fasern eine kompakte Schicht, wobei einige dieser Fasern auch am Ende der Federmuskulatur erscheinen. Weiterhin finden sich runde, teilweise laminäre Kondensationen von Kollagengewebe in der Dermis nahe der Follikel, die die Vorstufen der sensorischen Herbst'schen Korpuskel darstellen, die sich erst in der weiteren Entwicklung nach dem Schlüpfen vollständig ausbilden (LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

Der Körper des Kükens ist nur teilweise mit Nestlingsdunen bedeckt, vor allem an den Flügeln und Flanken, da sich die Flugfedern schneller entwickeln als das übrige Federkleid (YU et al., 2004).

5. Material und Methoden

5.1. Untersuchungsmaterial

Die Proben wurden Embryonen der Haushuhnrasse „White Leghorn“ entnommen, die wir freundlicherweise von der Geflügelklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt bekamen. Die Entnahme erfolgte täglich an den Entwicklungstagen vier bis zehn. Der Euthanasierung der Tiere mittels Chloroformdämpfen folgte die vorsichtige Freipräparation der Embryonen aus den umgebenden Hüllen (Ei- und Embryonalhüllen) und die sofortige Fixierung in Bouin'scher Lösung (BÖCK, 1989). Unter Berücksichtigung bestimmter morphologischer Gesichtspunkte (s. z.B. HAMBURGER und HAMILTON, 1951) wurde das Alter der Tiere möglichst genau bestimmt.

Aufgrund seiner geringen Größe wurde der gesamte Embryo in Paraffin eingebettet und histologisch aufgearbeitet. Bei der Auswertung wurde nur die Haut mit ihren beginnenden Federanlagen berücksichtigt. In den darauf folgenden Tagen wurde an jedem zweiten Tag bis zum Schlupf (Tag 19) eine Probe entnommen. Sie stammte aus dem Rückenbereich des Embryos. Zum Vergleich wurden Proben der Haut eines erwachsenen Huhnes aus dem Rückenbereich entnommen.

5.2. Stadierung der Embryonen

Für die Betrachtung der schnell ablaufenden embryonalen Strukturentwicklung erscheint eine Angabe des Alters der Embryonen nach ihrem Bebrütungstag als zu grob. Eine differenziertere Unterteilung ermöglicht die Stadierung nach HAMBURGER und HAMILTON (1951), die die Embryonen nach verschiedenen morphologischen Merkmalen charakterisiert. So kann eine Schwankung der Bebrütungstemperatur, die sich direkt auf die Entwicklungsgeschwindigkeit auswirkt (STEINKE, 1983), mit berücksichtigt werden. Für diese Arbeit wurden die Embryonen bei einer mittleren Temperatur von 37,8°C bebrütet.

Die folgende Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der für die Arbeit relevanten Stadien mit den entsprechenden Bebrütungstagen. Die folgenden Altersangaben beziehen sich auf die Stadierung nach HAMBURGER und HAMILTON (1951), so dass hierfür die

Kürzel HH verwendet werden. HAMBURGER und HAMILTON (1951) unterteilten die Embryonalentwicklung in 45 Stadien, von denen nur einige in dieser Arbeit berücksichtigt wurden.

Tabelle 1: Vergleich der verwendeten Stadien nach HAMBURGER und HAMILTON (1951) mit den Bebrütungstagen bei einer Bruttemperatur von 37,8°C

Stadium HH	Bebrütungstag
23 – 24	4
25 – 27	5
28 – 29	6
30 – 32	7
33 – 34	8
35	9
36	10
37	11
38	12
39	13
40	14
41	15
42	16
43	17
44	18
45	19

5.3. Histologische und histochemische Methoden

5.3.1. Einbettung der Proben

Ein Teil der Proben wurde in Paraffin eingebettet, der andere Teil in Technovit 7100, einem wasserlöslichen, schrumpfungsfreien Hydroxyethylmethacrylat (HANSTEDE und GERRITS, 1983). Zur problemlosen Einbettung wurden die Proben vorher mehrmals mit 70% igen Alkohol gespült, um die Pikrinsäure der Bouin`schen Lösung auszuwaschen. Für die Einbettung in Technovit wurde dem 70%igen Alkohol zusätzlich einige Tropfen Ammoniaklösung zum Spülen beigemischt.

Die Proben für die Paraffineinbettung durchliefen eine aufsteigende Alkoholreihe bis in Xylol, danach kamen sie in flüssiges Paraffin und wurden ausgegossen.

Die Proben durchliefen für die Einbettung in Technovit 7100 (Kulzer) ebenfalls eine aufsteigende Alkoholreihe und wurden über Nacht in Technovit 7100 mit Härter 1 gelagert. Nach Hinzufügung von Härter 2 wurden die Proben in einer Spezialform ausgegossen und nach kompletter Aushärtung jeweils mit Technovit 3040 (Kulzer) auf einen Plastikblock aufgeklebt.

5.3.2. Anfertigung histologischer Schnitte

Die Anfertigung der Paraffinschnitte geschah mit einem Schlittenmikrotom (Reichert-Jung) mit einer Schnittdicke von 3 µm, danach folgte eine Streckung der Schnitte in einem 37°C warmen Wasserbad und das Aufziehen auf einen beschichteten Objektträger. Getrocknet wurden die Schnitte über Nacht bei etwa 37°C im Wärmeschrank.

Die Technovitschnitte wurden mittels eines motorbetriebenen Rotationsmikrotoms (Autocut, Reichert-Jung) in einer Dicke von etwa 3µm angefertigt, auf 60°C warmen Wasser gestreckt, auf einen unbeschichteten Objektträger aufgezogen und nachfolgend auf diesem bei 90°C aufgebrannt.

5.3.3. Übersichtsfärbungen

Die Paraffinschnitte wurden zur Übersicht mit Hämalaun-Eosin (HE) (BÖCK, 1989) gefärbt. Nach dem Entparaffinieren über Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe wurde die Kernfärbung mit Hämalaun (nach Delafield) durchgeführt. Um die überschüssige Farbe zu entfernen, wurde 15 min mit Leitungswasser gespült. Danach ging es zur Gegenfärbung in 1% alkoholisches Eosin. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung wurde mit Eukitt eingedeckt.

Die Technovitschnitte wurden ohne Vorbehandlung eine Stunde in Hämalaun (nach Delafield) gefärbt und nach einer Spülung in Aqua dest. im wässrigen Eosin gegengefärbt. Nach Spülung in 80% Alkohol wurden die Schnitte nach dem Lufttrocknen mittels DePex eingedeckt.

Mit den Technovitschnitten wurde eine weitere Übersichtsfärbung durchgeführt, die Safranin-Toluidinblau-Färbung. Nach zweiminütiger Färbung der nicht vorbehandelten

Schnitte in der Safranin-Toluidinblau-Lösung wurden sie mit Aqua dest. sowie einer kurzen Alkoholreihe gespült und nach dem Lufttrocknen mit DePex eingedeckt.

An den Paraffinschnitten wurden die Immunhistochemie und auch die In-situ-Hybridisierung durchgeführt.

5.3.4. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient in dieser Arbeit dem Nachweis bestimmter Connexine über eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die verwendeten Connexin-Antikörper stammen von Kaninchen und Maus und sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Isotyp	Firma	Host	Verdünnung
Cx26	ZYMED	Mouse	0,5 mg/ml 1:75
Cx30	ZYMED	Rabbit	0,25 mg/ml 1:50
Cx31	Biologo	Rabbit	1 mg/ml 1:100
Cx32	Alpha diagnostic	Rabbit	1 mg/ml 1:200
Cx43	ZYMED	Rabbit	0,25 mg/ml 1:100
Cx45A	Biotrend	Mouse	1 mg/ml 1:50

Während mehrerer Probereaktionen wurde die spezifische Verdünnung für die einzelnen Nachweise herausgefunden, sowie die optimalen Reaktionsbedingungen, wie die Temperatur und die Zeit, in der der Antikörper optimal wirken kann. Die besten Ergebnisse für alle in dieser Arbeit benutzten Antikörper ergaben sich bei einer Reaktionsdauer von etwa zwölf Stunden und einer optimalen Temperatur von 4°C.

Das Grundrezept für Paraffinschnitte (Tab.3) wurde für alle Connexinnachweise gleich ausgeführt, nur die Konzentration der einzelnen Antikörper unterschied sich.

Tabelle 3: Reaktionsprotokoll für die Immunhistochemie

Entparaffinieren	2 x 10 min	Xylol
	2 min	Isopropylalkohol
	2 min	96% Alkohol
Hemmung der endogenen Peroxidase	30 min	80% Alkohol mit 30% H ₂ O ² 2% Lösung
	2 min	70% Alkohol
Spülung	3 x 5 min	PBS
Vorbehandlung zur Antigendemaskierung	30 min bei 37°C	Trypsin 0,1 % pH 7,6
	3 x 5 min	PBS
Blockade unspezifischer Reaktionen	20 min	NGS in PBS (1:5)
Primärer Antikörper	Über Nacht bei 4°C	Spezifische Verdünnung
Spülung	3 x 5 min	PBS
Sekundärer Antikörper und Amplifikation	30 min	EnVision-System (DaKo)
Spülung	3 x 5 min	PBS
Detektion und Visualisierung	5 min	DAB EnVision –System (DaKo)
Spülung	5 min	PBS
	2 x 10 min	PBS
Dehydratation	Je 2 min	Aufsteigende Alkoholreihe
	2 x 5 min	Xylol
Eindeckung		Eukitt
Lufttrocknen		

Zum Spülen wurde ein PBS-Puffer benutzt, der aus Aqua dest., NaCl und Natriumdihydrogenphosphat besteht und mit Natronlauge auf einen pH von 7,2 eingestellt wird.

NGS ist ein neutrales Ziegenserum, welches mit PBS verdünnt unspezifische Reaktionen blockiert.

5.3.4.1. Kontrollen

Als Negativkontrollen wurden Schnitte mitgeführt, die bis auf die Behandlung mit dem 1. Antikörper den gesamten Reaktionsweg durchliefen. Dadurch konnte eine Kreuzreaktion mit auf den Schnitten vorhandenen Proteinen ausgeschlossen werden. In einer zusätzlichen Negativkontrolle wurde auch der 2. Antikörper aus dem EnVision-System DaKo weggelassen, so dass nur mit dem Substrat DAB die Reaktion durchgeführt wurde, als Spezifitätskontrolle für das DAB.

Für die Positivkontrollen wurden für Cx26 und Cx32 Schnitte von Mäuseleber mitgeführt, für Cx30 und Cx31 Mäusehaut und für Cx45 Mäuseherz, die einen hohen Anteil der beschriebenen Connexine beinhalten, so dass eindeutig wird, dass die bestimmten Antikörper auch wirklich mit dem spezifischen Antigen reagieren (zur Methodik vergl. HORNICKEL et al., 2011).

5.3.4.2. Ergebnisdokumentation

Nach der oben beschriebenen Behandlung wurden die Schnitte auf ihre Struktur- und Reaktionsqualität kontrolliert und anschließend fotografiert. Die Fotos wurden an einem ZEISS Axioskop Mikroskop mit Hilfe einer digitalen Kamera (Olympus DP 70) in verschiedenen Vergrößerungen dokumentiert.

5.3.5. In-situ-Hybridisierung

5.3.5.1. Herstellung der spezifischen Gensonden für die In-situ-Hybridisierung

Zum eindeutigen Nachweis der spezifischen Connexine wurde anhand dreier ausgewählter Connexine eine In-situ-Hybridisierung durchgeführt. Mittels dieser Technik wird die spezifische RNA in einer Zelle nachgewiesen, die beweist, dass ein bestimmtes Protein hier auch wirklich synthetisiert wird. Für diese Arbeit wurden Cx26, Cx30 und Cx32 ausgesucht.

Zur Durchführung der In-situ-Hybridisierung wird die bestimmte mRNA benötigt, die aus der DNA transferiert werden muss. Die ursprüngliche Cx-DNA für Cx26, Cx30 oder Cx32 im jeweiligen Plasmidvektor stellte uns freundlicherweise Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo (Institut für Biophysik, Leibniz Universität Hannover) zur Verfügung.

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA, E. coli-Transformation und Restriktionsanalyse wurde nach SAMBROOK und RUSSEL (2001) durchgeführt.

Die Connexin cDNA-Moleküle wurden in den pCRII-TOPO Vector subkloniert, der auf einer Seite der multiple cloning site eine SP6- und auf der anderen Seite eine T7-Promotorregion trägt. Die Orientierung der jeweiligen cDNA wurde durch Restriktionsanalyse ermittelt und über DNA-Sequenzierung verifiziert. Sense bzw. Antisense RNA-Moleküle wurden nach Synthese mit SP6- oder T7-RNA-Polymerase mit Digoxigenin-UTP markiert. Hierzu wurde der DIG RNA Labeling KIT (SP6/T7) von

Roche Applied Science laut Anleitung des Herstellers eingesetzt. In der späteren Datenanalyse konnte kein Unterschied zwischen RNA-Sonden gefunden werden, die mit linearisierten oder nicht-linearisierten Plasmiden hergestellt wurden. Die erfolgreiche RNA-Synthese wurde mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft.

Antisense-Sonden wurden in den Gewebeproben für die Hybridisierung eingesetzt, während Sense-Sonden als Negativkontrolle dienten.

5.3.5.2. Reaktionsprotokoll der In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung wurde an ausgesuchten Paraffinschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden von Embryonen im Alter von 4, 7, 9, 11, 13 und 17 Tagen durchgeführt und zum Vergleich noch an Schnitten von einem adulten Tier.

In Tab. 4 wird die In-situ-Hybridisierung anhand eines abgeänderten Protokolls von Dr. M.K.–H. Schäfer, Philipps-Universität Marburg (Anatomisches Institut) dargestellt.

Tab. 4: Reaktionsprotokoll der In-situ-Hybridisierung

Entparaffinierung und Rehydrierung	2 mal 10 min	Xylol
	Je 5 min	Absteigende Alkoholreihe bis 50% Alkohol
	5 min	A. dest.
Vorbereitung	10 min	Sterilisierter PBS Puffer
	10 min bei 37°C	PK-Treatment
	Kurz	A. dest. (steril)
Spülen	3 mal 5 min	PBS (steril)
Hybridisierung	Über Nacht bei 60°C	5 ng/µl DIG RNA-Probe in Standard Hybridisationspuffer
Post-Hybridisierung	Kurz	2X SSC
	10 min	2X SSC
	10 min	1X SSC
	30 min 37°C	RNase A Treatment
	10 min	1X SSC
	10 min	0,5X SSC
	10 min	0,2X SSC
	60 min bei 60°C	0,2X SSC
	10 min	0,2X SSC
	10 min	A. dest .
DIG-Detektion	Kurz	Waschpuffer
	30 min	Blockergebrauchslösung
	30 min	Antikörpersubstanz

	3 mal 15 min	Waschpuffer
Visualisierung	2 mal 10 min	Detektionspuffer
	30 min	HNPP / Fast Red TR
	Kurz	Waschpuffer
	30 min	HNPP / Fast Red TR Mix
	10 min	A. dest. (redist.)
Eindecken		Movicol
Lufttrocknen im Dunklen		

5.3.5.2. Reagenzien für die In-situ-Hybridisierung

PK-Treatment bestehend aus der Proteinkinase K (0,1 µg/ml) im PK-Puffer, der aus 1 M TRIS (pH 8); 0,5 M EDTA (pH 8), Aqua dest. und der PK Stocklösung (10 mg/ ml) besteht.

Der SSC-Puffer besteht aus 3 M NaCl-Lösung und 0,3 M Natriumcitrat-Lösung bei einem pH von 7,0.

RNase A-Treatment besteht aus einem Puffer aus 10 mM Tris-Lösung vermischt mit 0,5 M NaCl-Lösung und 1mM EDTA-Lösung mit einem pH von 8, mit 20 µg/ml RNase A.

Die DIG Detektion wurde mittels DIG- Nucleacid Detectionskit gefolgt von der Visualisierung mittels HNPP Fluorescent Detection Kit von Roche Applied Science nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.3.5.4. Dokumentation

Die Fotos zur Dokumentation wurden mittels eines ZEISS Axioskop mit einer digitalen Kamera Olympus DP 70 und einem Grünfilter bei etwa 546 nm in unterschiedlichen Vergrößerungen angefertigt.

6. Ergebnisse

6.1. Ergebnisse der Immunhistochemie

Im Zusammenhang mit der bildlichen Darstellung der Befunde muss zunächst darauf hingewiesen werden, dass es äußerst schwierig war, die frühen Stadien, mit einer Größe der Embryonen von 1 bis 2,5 cm (Entwicklungsalter von 28 h bis 4 d) (KEIBEL und ABRAHAM, 1900), relevant zu dokumentieren. Da auch die auf die Antikörper ansprechenden Proteine der Zellen und Gewebe nur in sehr geringen Mengen auftraten, fiel auch die Farbreaktion relativ schwach aus. Dies ist nicht nur unter dem Aspekt zu sehen, dass die Connexine in die noch sehr dünnen Zellmembranen eingebaut wurden, sondern zudem die Bildung in den Zellorganellen bzw. eine Ansammlung im Zytoplasma zunächst lichtmikroskopisch nicht erfasst werden konnten. Hierzu mussten bei weiterführenden Untersuchungen ultrahistochemische Verfahren angewandt werden. Um den Einblick in das erste Geschehen etwas zu verbessern, wurden die Präparate daher auch mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie analysiert, die den mit der HRP-DAB Methodik (DAB EnVision System, DAKO) gebildeten bräunlichen Farbstoff deutlicher kennzeichnet, vgl. Fig. 16 S. 70. Diese Technik ist bereits seit einiger Zeit bekannt (s. z.B. MEYER et al., 1984).

6.1.1. Connexin26

Haut

Das Connexin26 lässt sich mittels immunhistochemischer Methodik ab dem 5. Entwicklungstag (Stadium 25 - 27 HH) im Hühnerembryo nachweisen. Dann ist das Connexin vereinzelt im Periderm vorhanden. Auch sind positive Reaktionen zwischen den Fibroblasten im Mesenchym auffindbar. Während der weiteren Entwicklung lässt sich Connexin26 vorzugsweise zwischen den langgestreckten Zellen des Periderms finden, doch zeigen auch die Zellen des Stratum basale Connexin26 an den lateralen Zellgrenzen und im Bereich zur Basalmembran hin. In der Dermis ist Connexin26 im Endothel der Gefäße deutlich erkennbar. Bei weiterer Proliferation der epidermalen Zellen mit Bildung eines Stratum intermedium, ab dem 11. Entwicklungstag (Stadium 37 HH), sind die Connexinreaktionen an apikalen und lateralen Zellwänden im Stratum intermedium sichtbar. Besonders in den vielen Zellfortsätzen, die mit den benachbarten

Zellen eine komplexe, verzahnte Kopplung zeigen, kann man die Connexine erkennen. Mit den Zellfortsätzen erhöhen die Zellen die Grenzfläche zu den Nachbarzellen und weisen somit eine rege interzelluläre Kommunikation auf. Im Stratum basale fällt Connexin26 vor allem im Bereich auf, wo die proliferierenden Zellen der Basalmembran anliegen und mit ihr verbunden sind. Im Periderm findet sich Connexin26 auch im apikalen Zellbereich, an der Grenzlinie von der Epidermis zur Basalmembran hin, die die Epidermis von der Dermis trennt, bzw. über die Epidermis mit der Dermis in Kontakt steht. Aber auch in den apikalen Zellwänden der Peridermzellen, über die der Embryo in Kontakt mit der Amnionflüssigkeit steht. Ab dem 13. Entwicklungstag (Stadium 39 HH) fällt auf, dass sich eine Expression des Connexin26 in der Epidermis fast nur noch auf das sich immer weiter differenzierende Stratum intermedium und das Periderm beschränkt. Das letztere wandelt sich langsam in ein Stratum corneum um, bis sich am 19. Entwicklungstag (Stadium 45 HH) nur noch in den Stratum corneum-Zellen Connexin26 nachweisen lässt. In der Dermis tritt dies Connexin, abgesehen von den Strukturen, die zur Federfollikelentwicklung gehören, nur noch in den Endothelzellen der Blutgefäße auf.

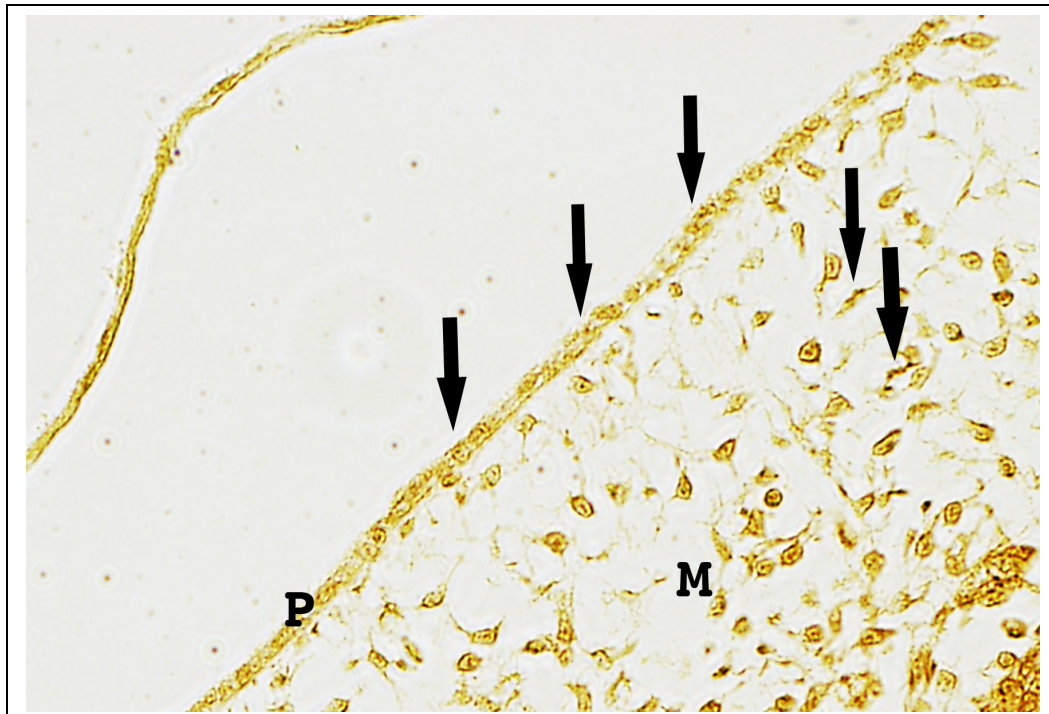


Fig.14: Cx26, Hühnerembryo 5. Entwicklungstag, Stadium 26/27 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Connexin26 mit Pfeilen gekennzeichnet im Periderm und Mesenchym

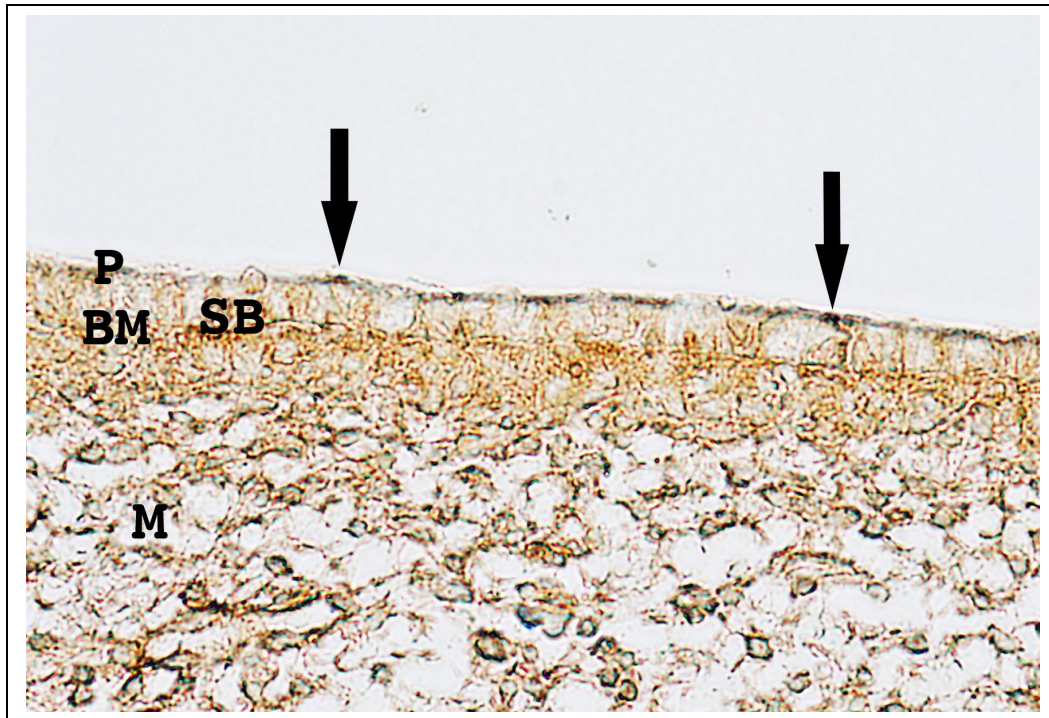


Fig.15: Cx26, Hühnerembryo 7. Entwicklungstag, Stadium 31/32 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin26 im Periderm, Stratum basale und nur noch vereinzelt im Mesenchym



Fig.16: Cx26, Hühnerembryo 11. Entwicklungstag, Stadium 37 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Phasenkontrast; Connexin26 im gesamten epidermalen Bereich und in den sich bildenden Fibroblastenvermehrungen im Mesenchym als frühes Stadium der Federanlage und im Endothel

Federfollikel

Connexin26 ist ab dem 10. Entwicklungstag (Stadium 36 HH) nicht nur in den epidermalen Zellen, sondern auch in den sich nun vermehrt proliferierenden Fibroblasten des Mesenchyms nachweisbar. Es zeigt somit eine starke Expression in den mesenchymalen Verdichtungen der Federplakode. Ab dem 11. Entwicklungstag (Stadium 37 HH) lässt sich das Connexin im fortschreitenden Wachstum der Federplakode über das Epithelniveau hinaus noch in den apikalen Fibroblasten nachweisen, im Bereich der epidermalen Zellen und der Endothelzellen der Blutgefäße. Am 13. Entwicklungstag (Stadium 39 HH) fällt auf, dass in der Federplakode auch die Connexin-Reaktion nur noch vereinzelt erkennbar ist, bis am 15. Entwicklungstag (Stadium 41 HH) Connexin26 wieder vermehrt im Stratum intermedium sichtbar wird, wobei eine langsame Ausdehnung des Stratum intermediums zu beobachten ist und in einigen Regionen auch schon ein Stratum transitivum hinzukommt. In den frühen Federstrukturen ist Connexin26 zu dieser Zeit nur in den epidermalen, langgestreckten, sich verhornenden Zellen nachweisbar. In der Dermis beschränkt sich der Connexin26 auf die Endothelzellen der Blutgefäße.

Ab dem 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) wird das Periderm langsam abgestreift und ein Stratum corneum bildet sich aus. Auch in der Federpapille, direkt unterhalb von Epidermis und Dermis, lässt sich Connexin26 aufzeigen. Im Stratum corneum und Stratum transitivum findet es sich bis zum 19. Entwicklungstag (Stadium 45 HH), also dem Tage des Schlupfes. Auch in den Primärleisten der jetzt vorhandenen Federn und den verhornenden Zellen des Federschaftes tritt Connexin26 auf. In der Dermis ist es deutlich im Endothel der Blutgefäße sichtbar. Connexin26 ist somit während der Entwicklung des Federfollikels nachweisbar, so dass bei unterschiedlich weit entwickelten Federfollikeln eine unterschiedliche Connexinexpression auffällt.

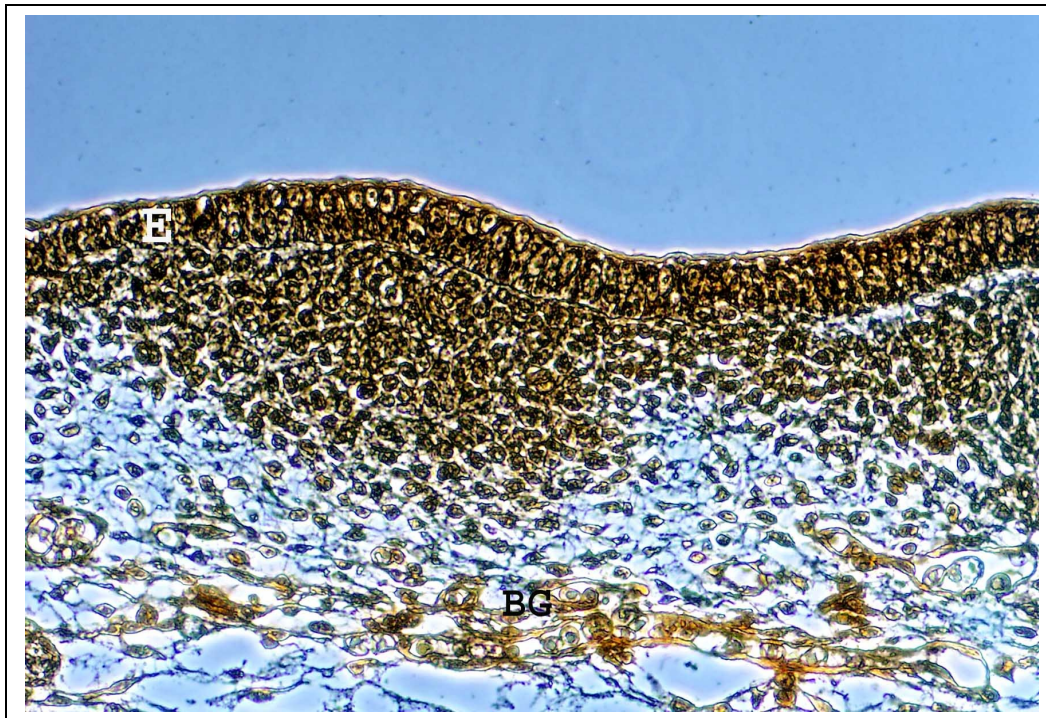


Fig.17: Cx26, Hühnerembryo 10. Entwicklungstag, Stadium 36 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Phasenkontrast; Connexin26 im Bereich der Epidermis und der mesenchymalen Verdichtungen, sowie des Endothels der Blutgefäße.

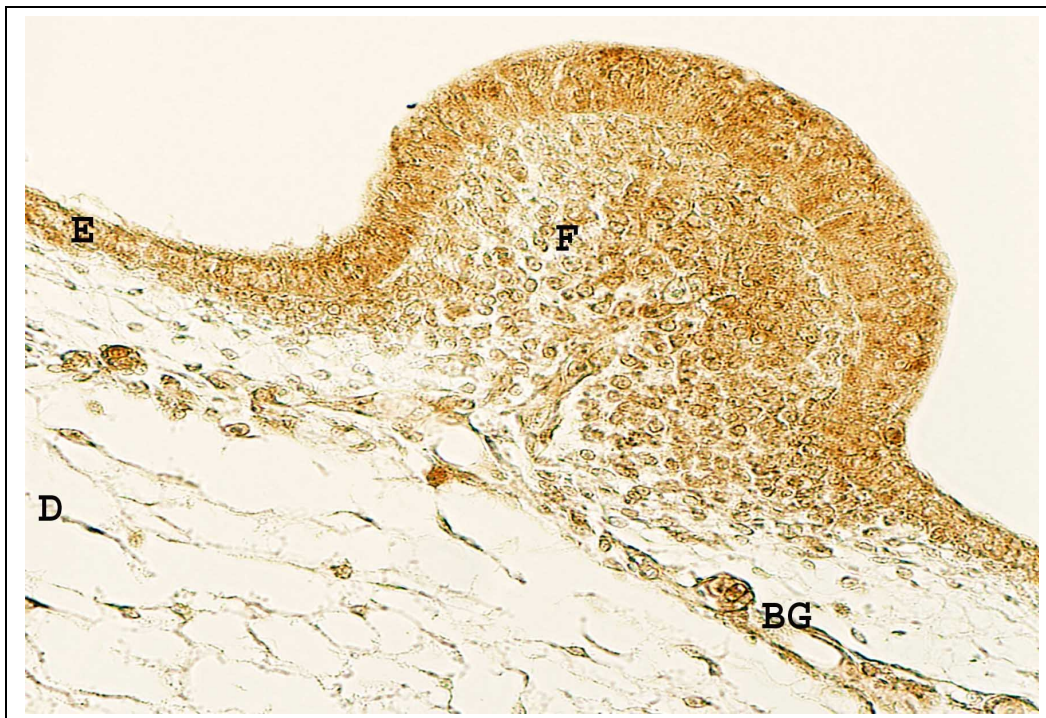


Fig.18: Cx26, Hühnerembryo 11. Entwicklungstag, Stadium 37 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Connexin26 in den sich weiter entwickelnden Federplakode und auch in den epidermalen Zellschichten



Fig.19: Cx26, Hühnerembryo 13. Entwicklungstag, Stadium 39 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin26 im Periderm der Federpulpa und der Epidermis im Bereich der Follikeleinstülpung

6.1.2. Connexin30

Haut

Connexin30 lässt sich im Laufe der Entwicklung der Haut in allen Stadien der Entwicklung nachweisen, doch ist das Expressionsmuster zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten auch unterschiedlich ausgeprägt. So ist dies Connexin um den 4. Entwicklungstag (Stadium 23/24 HH) vor allem im apikalen Bereich der Zellen des Stratum basale zum Periderm hin, im Periderm und vereinzelt im Mesenchym nachweisbar. Ab dem 6. Entwicklungstag (Stadium 28/29 HH) nimmt erstmal die Connexinexpression im Periderm ab, bleibt aber in den basalen Abschnitten der Stratum basale Zellen bestehen. Bei gleichzeitiger Zunahme der Connexinexpression in den apikalen Zellwänden der Mesenchymzellen direkt unterhalb der Basalmembran imponieren diese Anteile schon in niedrigen Vergrößerungen, so dass eine Basalmembran vorgetäuscht wird. Ab dem 10. Entwicklungstag (Stadium 36 HH) erkennt man wieder vereinzelt Connexine in den Peridermzellen, die dann bis zur vollständigen Umwandlung in ein Stratum corneum bestehen bleiben. Auffallend ist, dass eine Verbindung der Basalzellen untereinander über die lateralen Zellmembranen mittels Connexin30 nicht erkennbar ist. Ab dem 8. Entwicklungstag (Stadium 33/34 HH)

ist ein vermehrtes Expressionsmuster nicht nur in den epidermalen Zellen zu sehen, sondern zunehmend auch in den Zellen der mesenchymalen Verdichtungen unterhalb der Epidermis, die die Bildung der Federplakode initiieren. In der weiteren Entwicklung der mesenchymalen Verdichtungen nimmt dort die Expression von Connexin30 ab. Ab dem 11. Entwicklungstag (Stadium 37 HH) nimmt die Expression von Connexin30 in den mesenchymalen Zellen, die die spätere Dermis bilden immer weiter ab, in den epidermalen Zellen dagegen immer weiter zu, vor allem im sich schnell weiter entwickelnden Stratum intermedium, welches in diesem Zeitraum durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet ist. Bei der weiteren Entwicklung der Hautschichten fällt insgesamt auf, dass in den epidermalen Zellen immer auch Connexin30 gebildet wird, während dies in den Zellen der Dermis auf die Endothelzellen der Blutgefäße beschränkt bleibt. So ist z.B. am 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) vor allem in den sich jetzt differenzierenden Stratum corneum und Stratum intermedium der Epidermis eindeutig Connexin30 nachweisbar.

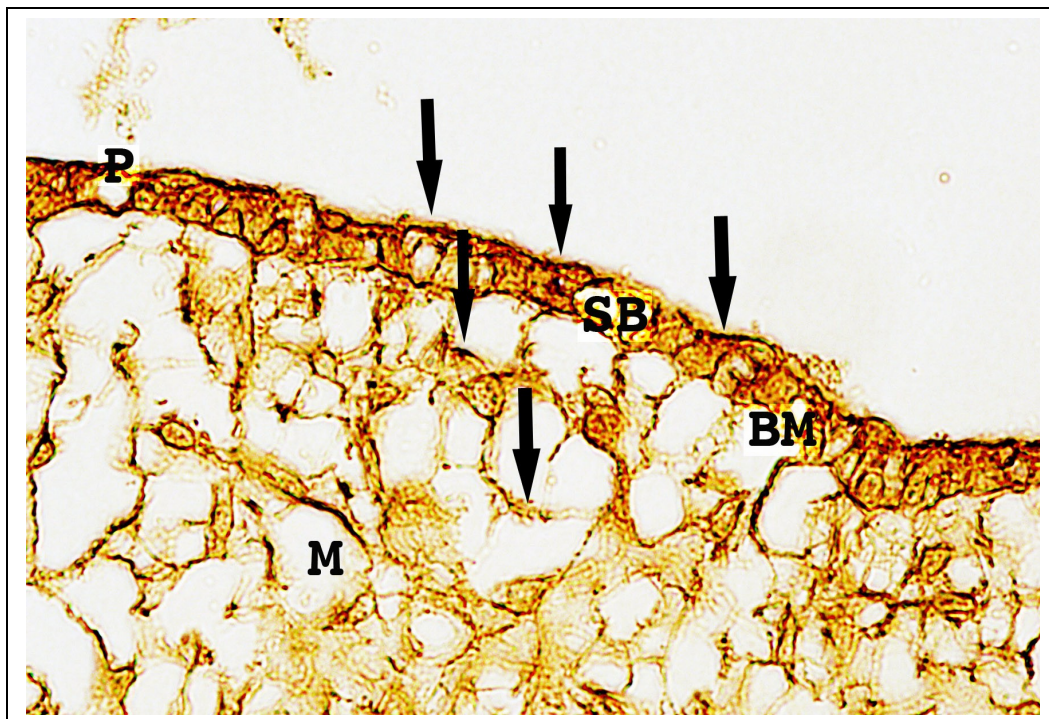


Fig.20: Cx30, Hühnerembryo 4. Entwicklungstag, Stadium 23/24 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin30 in den epidermalen und mesenchymalen Zellen (mit Pfeilen gekennzeichnet).

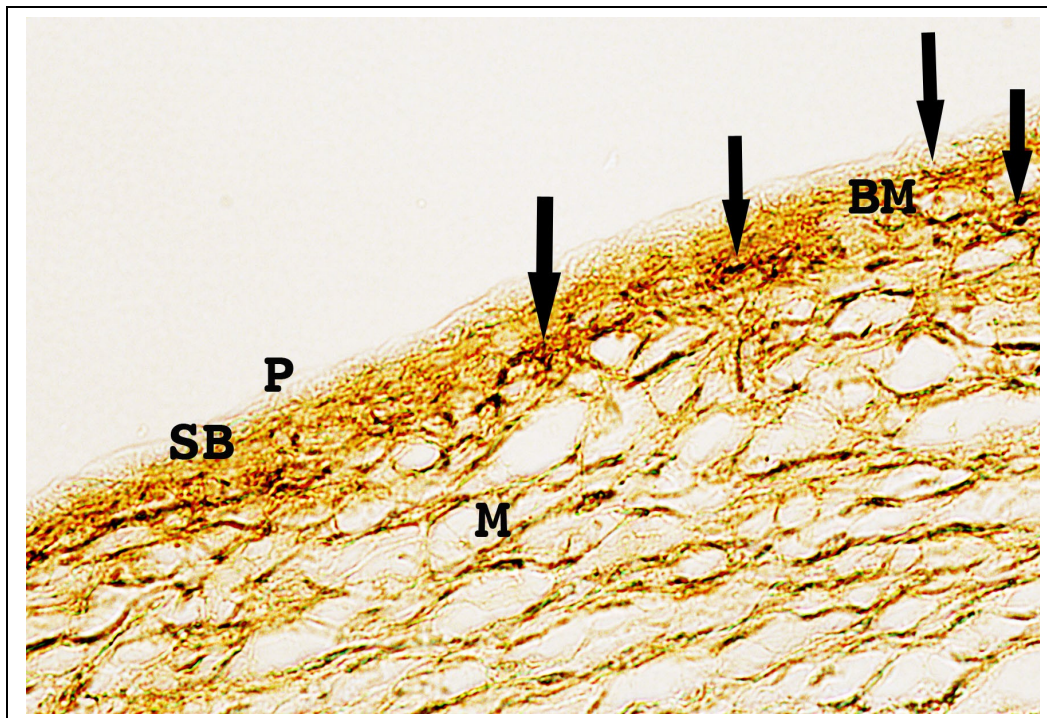


Fig.21: Cx30, Hühnerembryo 6. Entwicklungstag, Stadium 28/29 HH, Objektivvergrößerung 40fach; eindeutig kein Nachweis von Connexin30 mehr im Periderm, v.a. unterhalb der Basalmembran.

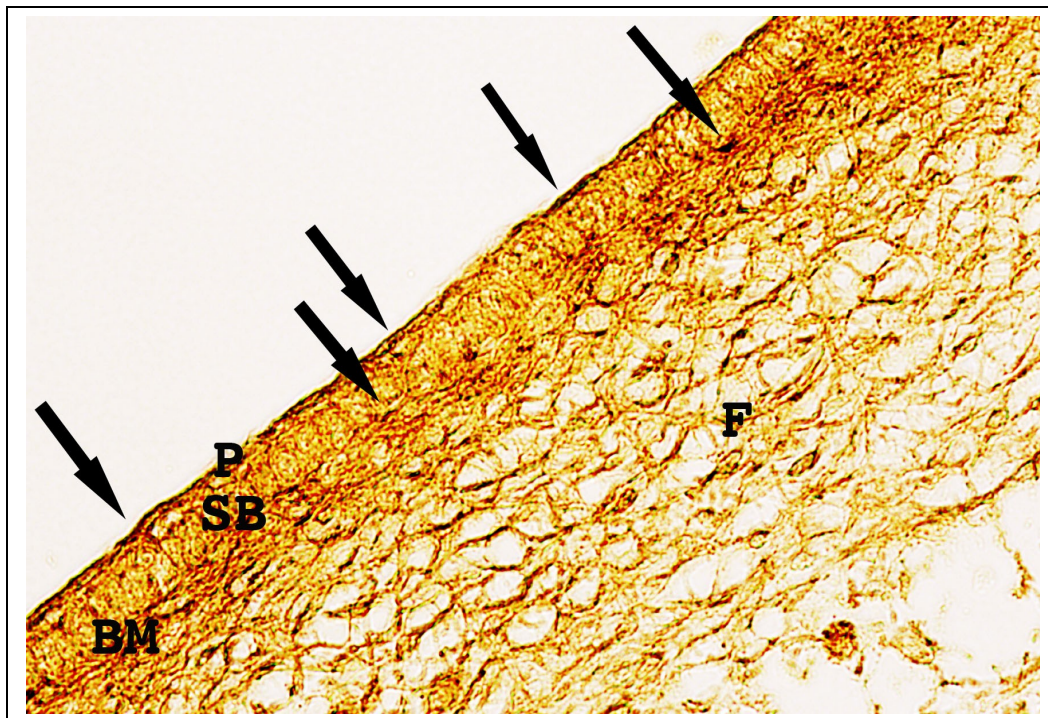


Fig.22: Cx30, Hühnerembryo 10. Entwicklungstag, Stadium 36 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin30 tritt wieder im Periderm auf, hauptsächlich immer noch im Bereich der Basalmembran.

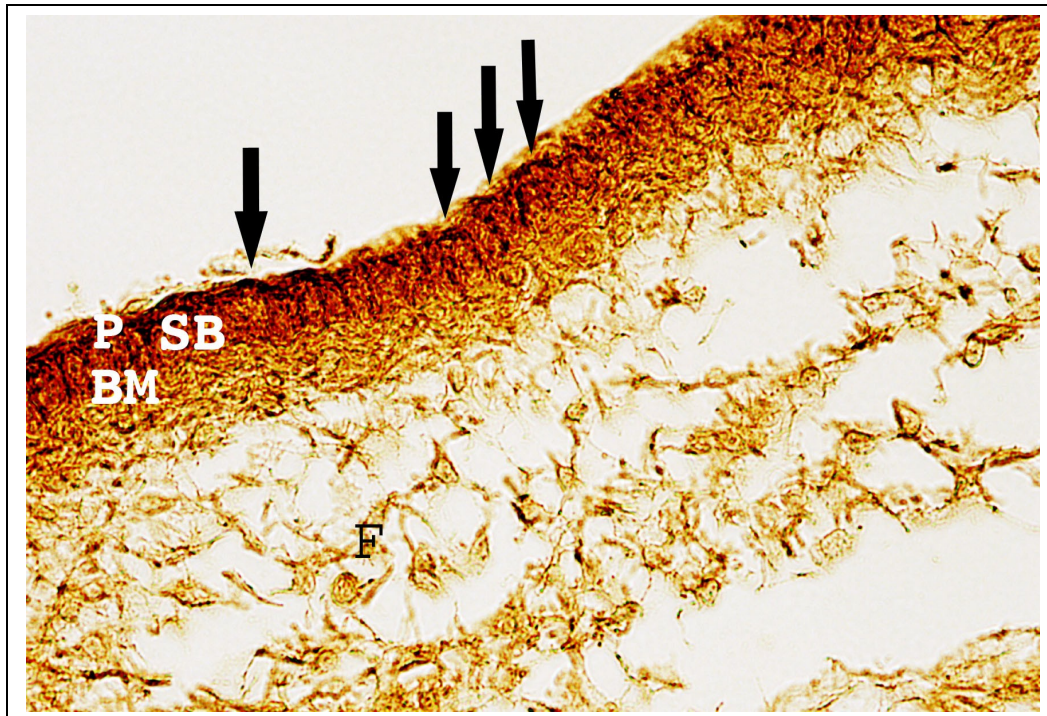


Fig.23: Cx30, Hühnerembryo 11. Entwicklungstag, Stadium 37 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin30 eindeutig im Bereich des Periderms, dichtere Fibroblastenformation im Bereich der späteren Dermis und locker im Bereich der späteren Hypodermis.

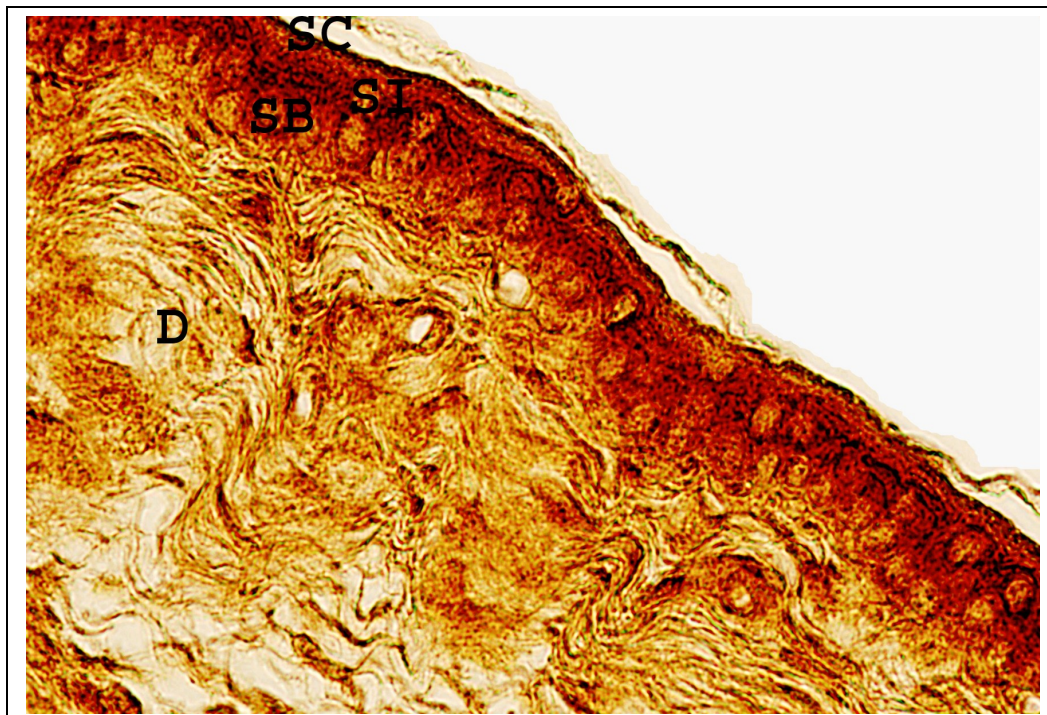


Fig.24: Cx30, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin30 im epidermalen Bereich und auch zwischen den Fibroblasten der Dermis.

Federfollikel

Ab dem 10. Entwicklungstag (Stadium 36 HH) ist ein erhöhtes Expressionsmuster von Connexin30 in den epidermalen Zellen im Bereich der sich entwickelnden Federplakode sichtbar. Die Plakode beginnt dann, sich aufgrund der zunehmenden Proliferation der epidermalen Zellen über das Plateau der umgebenen Epidermis hinaus zu erhöhen, besonders deutlich im Stratum intermedium, und durch die Proliferation der Fibroblasten im Mesenchym. Dort ist während der Proliferation der Zellen vor allem in den Fibroblasten reichlich Connexin30 nachweisbar, aber auch in der Verdichtung der Epidermis in diesen Gebieten erkennt man eine Erhöhung der Expressionsrate. Im Bereich des sich stark vermehrenden Stratum intermedium sind die Zellen mittels reichlich Connexin30 untereinander verbunden, was insbesondere für deren laterale Plasmamembranen gilt. Ab dem 11. Entwicklungstag (Stadium 37 HH) verschiebt sich das Expressionsmuster weiter in Richtung Stratum intermedium und Periderm. Die Zellen epidermalen Ursprungs in den sich entwickelnden Federn weisen im Gegensatz zu den Zellen mesenchymalen Ursprungs eine vermehrte Expression des Connexins auf. Ab dem 13. Entwicklungstag (Stadium 39 HH) sind zudem bestimmte Zellen in der Dermis Connexin30-positiv, ohne dass man ihnen einen direkten epidermalen Ursprung zuordnen kann. So lässt sich das Protein auch in den Endothelzellen und in den Vorläuferzellen der späteren Federmuskulatur nachweisen. In der weiteren Entwicklung sind positive Reaktionsanfärbungen im Bereich der apikalen Zellen des Stratum intermedium und dem noch vorhandenen Periderm zu sehen, und weiter um die Federfollikel herum im Bereich der Federbasis. Während der folgenden Entwicklung nimmt die Expression in den Endothelzellen der Gefäße wieder ab, wobei sie allerdings im Bereich der Epidermis bestehen bleibt.

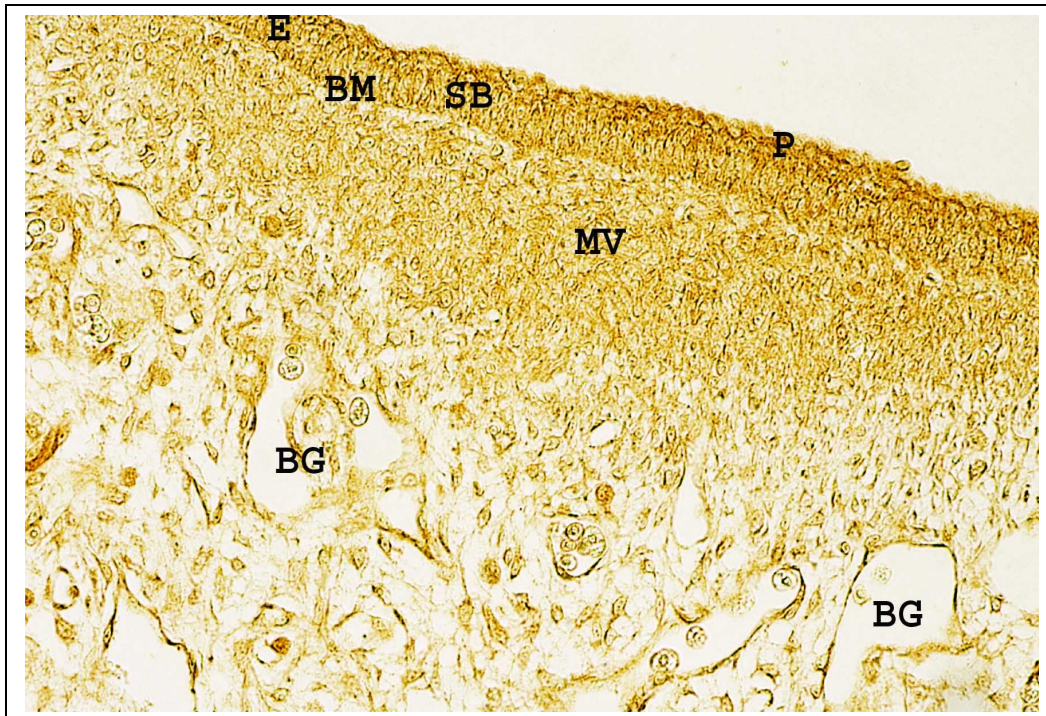


Fig.25: Cx30 Hühnerembryo 7. Entwicklungstag, Stadium 30 - 32 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Connexin30 im Periderm und den mesenchymalen Zellvermehrungen und im Endothel der Blutgefäße.

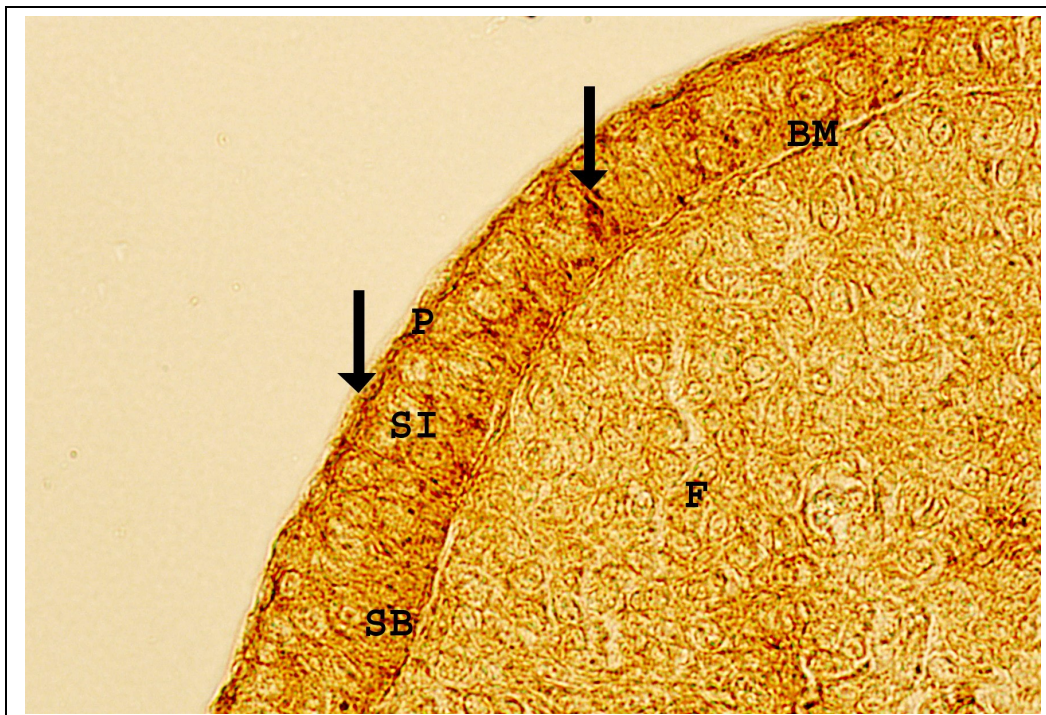


Fig.26: Cx30, Hühnerembryo 10. Entwicklungstag, Stadium 36 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin30 vor allem im Bereich der epidermalen Zellschichten.

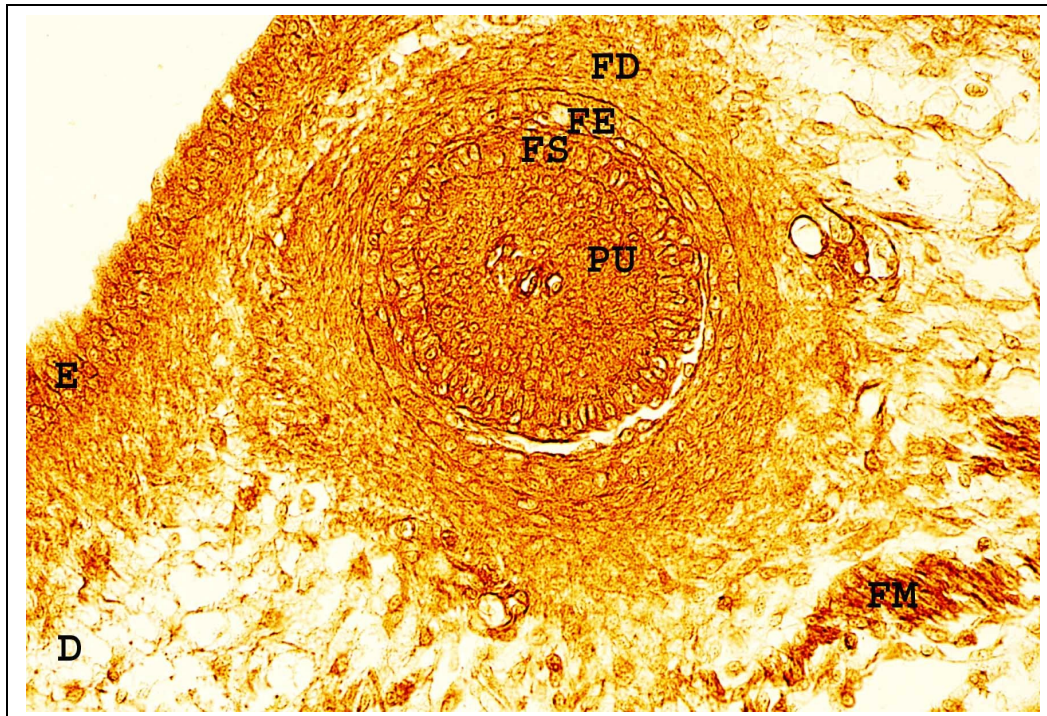


Fig.27: Cx30, Hühnerembryo 13. Entwicklungstag, Stadium 39 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Connexin30 in den epidermalen Zellen der Haut und des Federfollikels, des Endothels der Blutgefäße und in der Federmuskulatur.

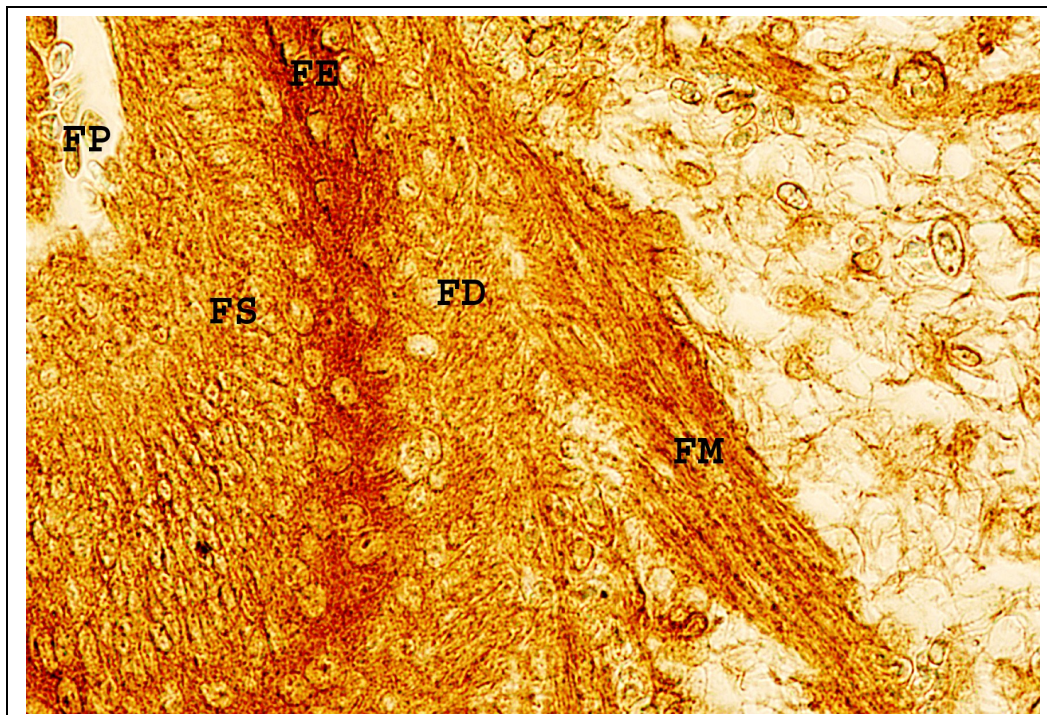


Fig.28: Cx30, Hühnerembryo 15. Entwicklungstag, Stadium 41 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin30 in den Follikelepithelzellen und der Federmuskulatur.

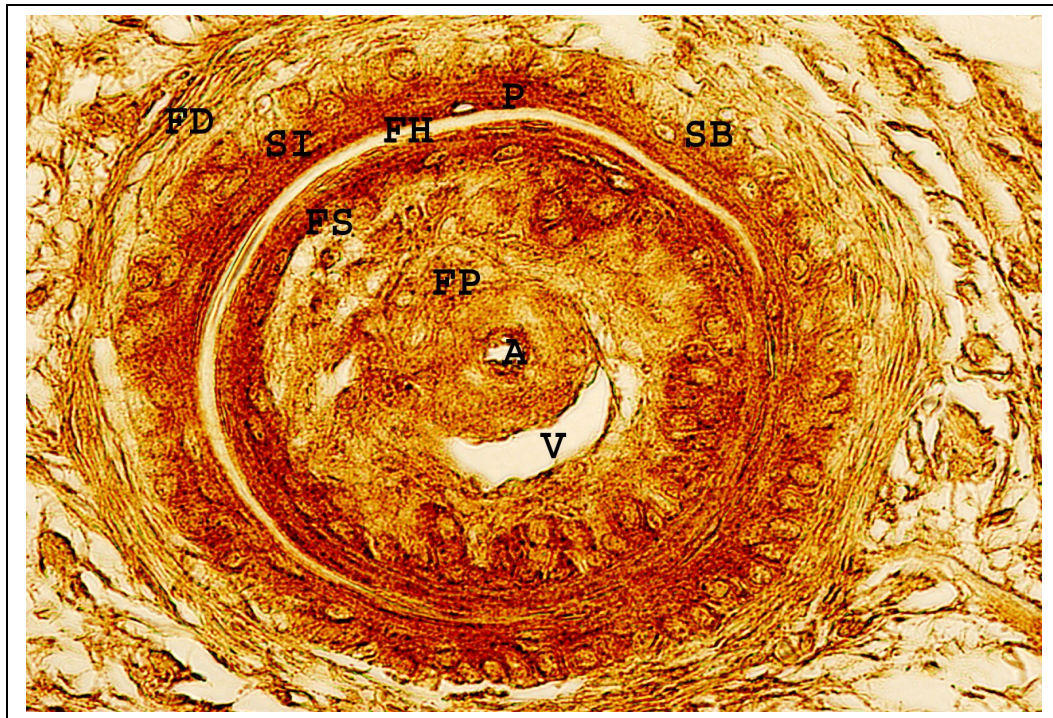


Fig.29: Cx30, Hühnerembryo 19. Entwicklungstag, Stadium 45 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin30 in den epidermalen Zellen des Follikelepithels und der Federscheide, auch in den Endothelzellen.

6.1.3. Connexin31

Haut

Connexin31 ist während der embryonalen Entwicklung in der Epidermis und Dermis des Hühnchens nachweisbar. Dabei ist auffällig, dass es in den epidermalen Schichten v.a. an den lateralen Zellgrenzen der Stratum intermedium-Zellen auftritt. Die Syntheserate scheint im Gegensatz zu anderen Connexinen in diesen epidermalen Schichten weniger intensiv abzulaufen. Die Fibroblasten des Mesenchyms zeigen einen deutlichen Nachweis von Connexin31, wobei dieser bei der Vermehrung der Zellen intensiver wird. Während des 13. Entwicklungstages (Stadium 39 HH) ist der Nachweis für das Connexin in den epidermalen Schichten und auch in den dermalen Zellen deutlich, ebenfalls in den Endothelzellen der Blutgefäße. Ab dem 14. Entwicklungstag (Stadium 40 HH) bildet sich langsam das Stratum corneum, in dessen Zellen anfangs noch Connexin31 auftritt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung der Epidermis lässt sich ab dem 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) kein Connexin31 mehr in dieser Schicht finden. Insgesamt zeigen sich auch nur im Stratum intermedium noch vereinzelt Anfärbungen für Connexin31. Im Gegensatz dazu offenbaren die dermalen Zellen einen

eindeutigen Nachweis dieses Connexins, zudem lässt es sich zwischen den Fettzellen der Hypodermis finden.

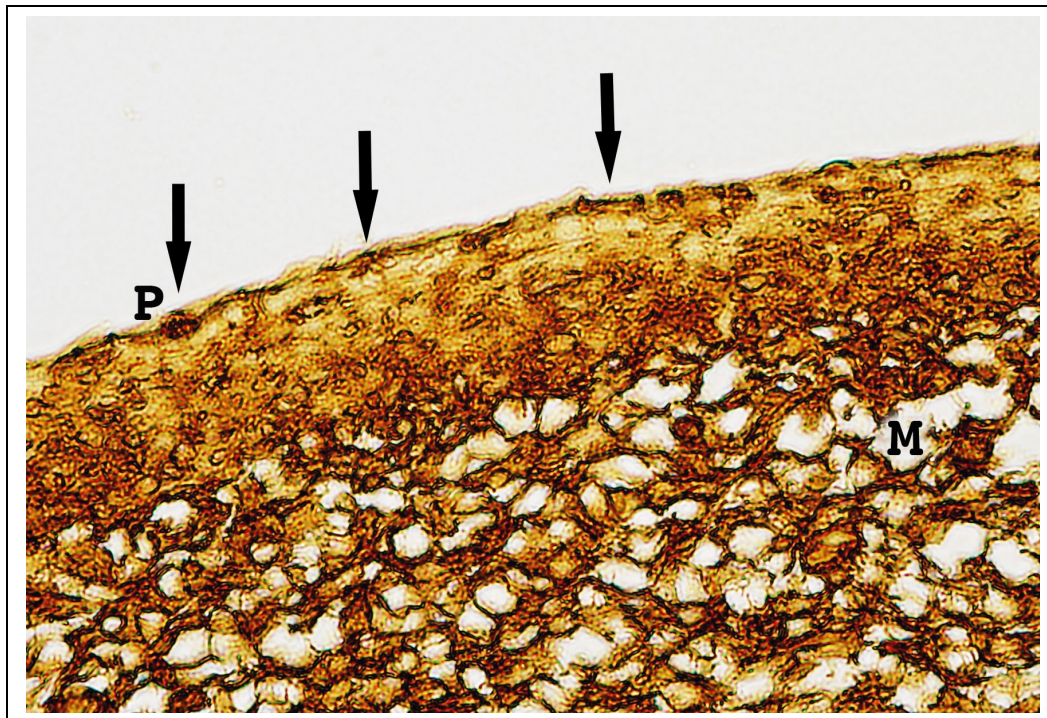


Fig.30: Cx31, Hühnerembryo 7. Entwicklungstag, Stadium 30 - 32 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin31 im Bereich des Periderms und des Mesenchyms.

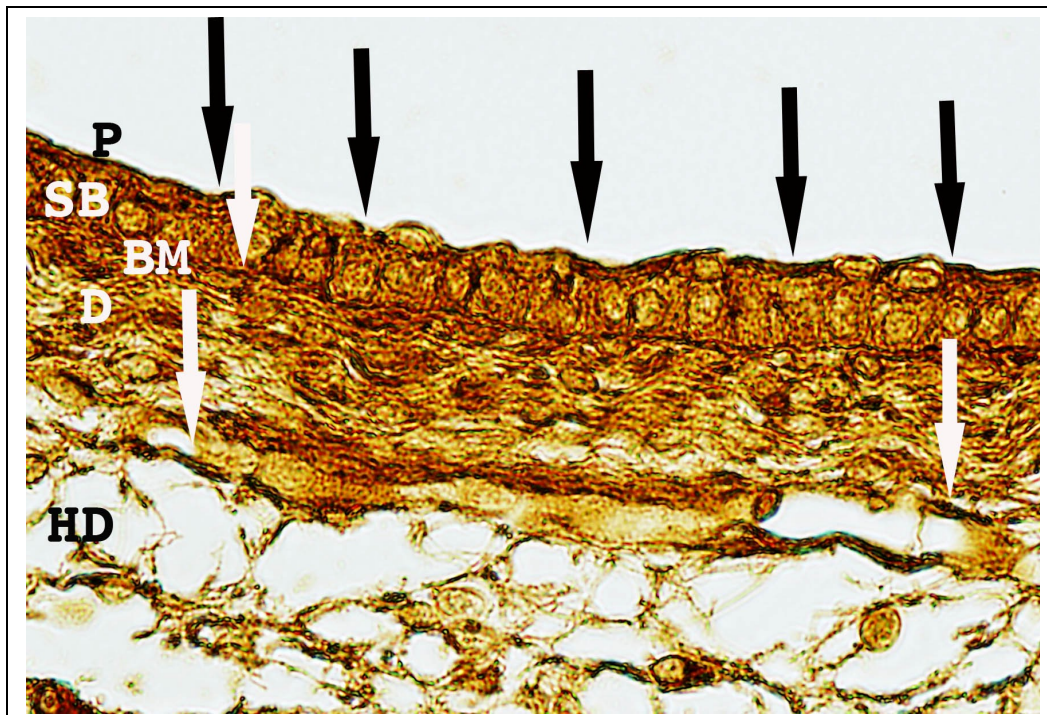


Fig.31: Cx31, Hühnerembryo 14. Entwicklungstag, Stadium 40 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Darstellung von Connexin31 in allen Schichten der Haut

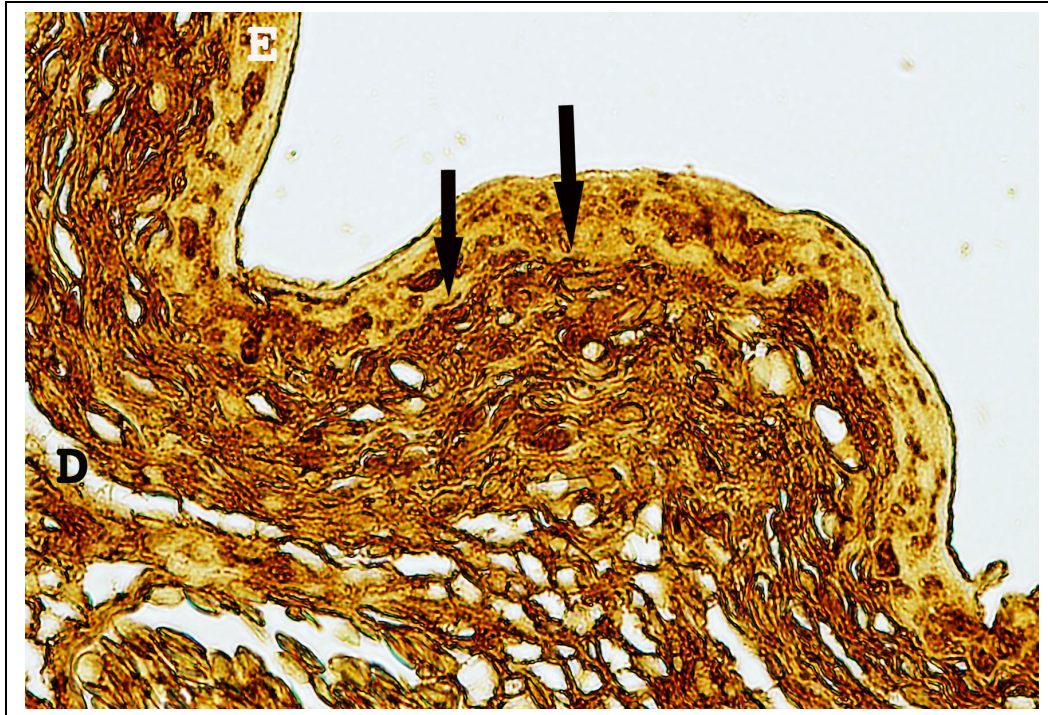


Fig.32: Cx31, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin31 vereinzelt im Bereich der Epidermis und vermehrt im Bereich der Dermis.

Federfollikel

Ab dem 10. Entwicklungstag (Stadium 36 HH) wird deutlich, dass mehr Connexin31 von den Zellen der Dermis synthetisiert wird, als von den epidermalen Zellen. So tritt es unterhalb der sich bildenden Federplakoden in den mesenchymalen Zellverdichtungen deutlich auf; in der Epidermis aber nur vereinzelt und da vor allem im Stratum intermedium, welches sich zusehends im Bereich der Federplakode bildet. Unterhalb der Basalmembran findet sich auf der Seite zur Dermis hin gleichfalls vermehrt Connexin31, so dass die Basalmembran verdichtet erscheint. Im weiteren Verlauf der Entwicklung zeigen sich positive Nachweise vor allem in den sich ausdifferenzierenden Bindegewebszellen. Auch in den Zellen der Federmuskulatur sind die Connexine in den lateralen Zellverbindungen nachweisbar. Die Endothelzellen der Gefäße synthetisieren, wie auch schon Connexin26, Connexin30 und Connexin32, zusätzlich Connexin31, wobei auffällt, dass dies nicht für die Erythrozyten zutrifft und es sich auch nicht in ihrer Zellmembran nachweisen lässt. Das Stratum corneum zeigt im Rahmen seiner Entwicklung nur anfangs einen leicht positiven Nachweis für Connexin31, später nicht mehr, d.h. ausgereifte Keratinozyten, die das Stratum corneum bilden, reagieren negativ. Neben den eindeutigen Nachweisen dieses Connexins in den Federmuskelzellen, den Endothelzellen und in den Kollagenfasern der Follikeldermis,

ist kein Nachweis in den elastischen Fasern der Follikeldermis möglich. Dies ist deutlich ab dem 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) erkennbar.

Zusammenfassend gesehen ist Connexin31 ein Connexin welches vor allem in dermalen Zellen gebildet und nachgewiesen werden kann. In den epidermalen Zellen zeigt es eine hohe Expressionsrate zu der Zeit, in der eine hohe Zellvermehrung auftritt, d.h. es ist vor allem im Bereich des Stratum intermedium sichtbar, besonders wenn sich in kurzer Zeit viele Zellen bilden. So ist auch bei der Bildung der Zellen der Federspule eine Expression von Connexin31 erkennbar. Sobald die Zellen der Federspule sich zu reifen Keratinozyten entwickelt haben, kann man hier kein Connexin mehr finden, wohingegen in den meisten dermalen Zellen Connexin31 noch nachweisbar bleibt.

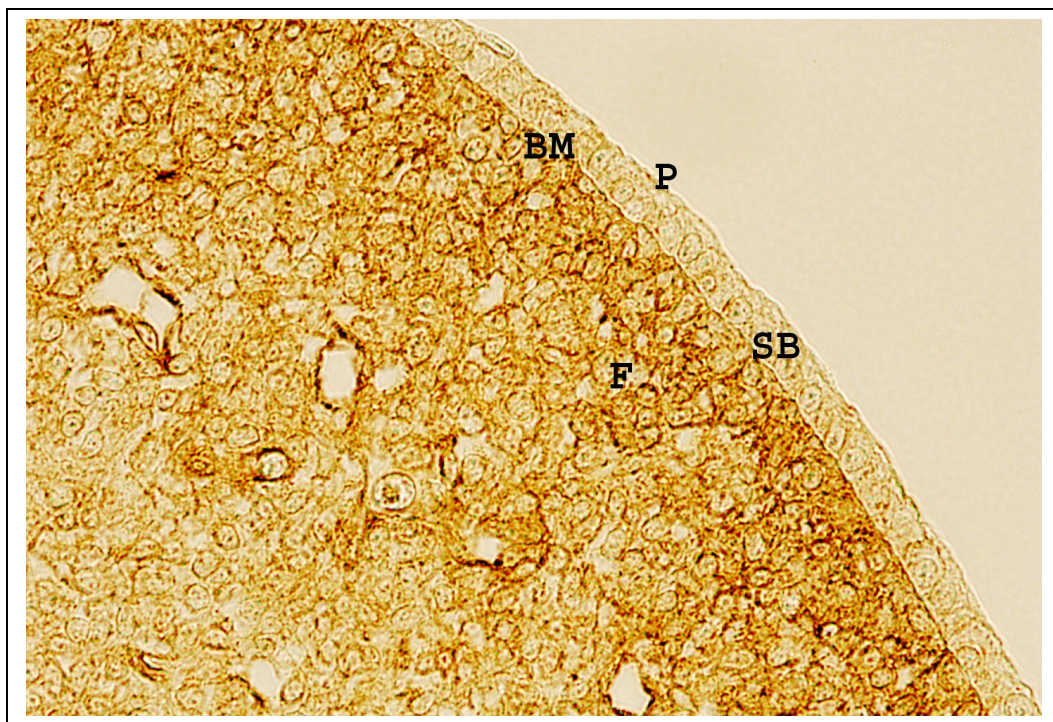


Fig.33: Cx31, Hühnerembryo 7. Entwicklungstag, Stadium 30 - 32 HH, Objektivergrößerung 40fach; Connexin31 nachweisbar zwischen den proliferierenden Fibroblasten, nicht in der Epidermis.

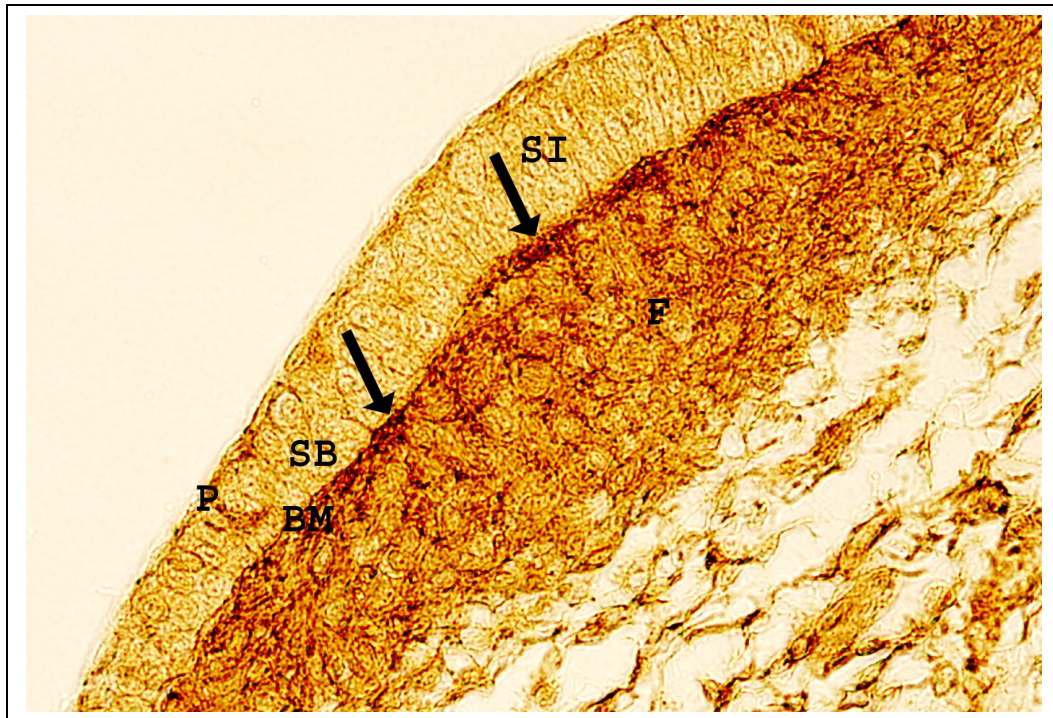


Fig.34: Cx31, Hühnerembryo 9. Entwicklungstag, Stadium 35 HH, Objektivergrößerung 40fach; In dem sich bildenden Stratum intermedium ist kein Connexin31 nachweisbar, sondern in den proliferierenden Fibroblasten.

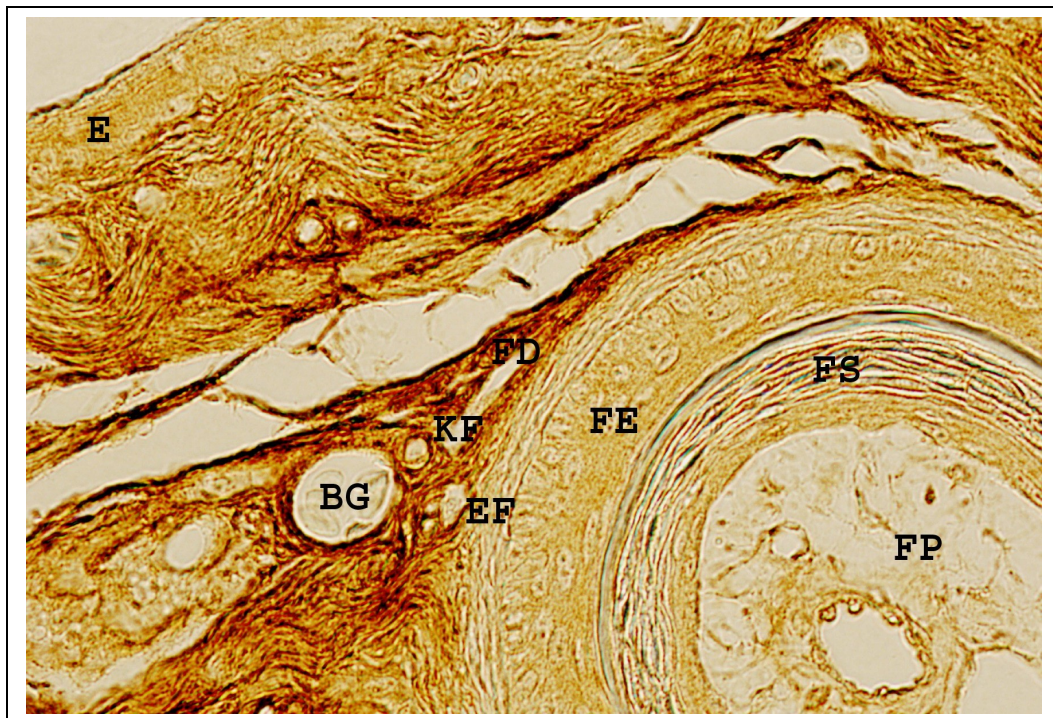


Fig.35: Cx31, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivergrößerung 40fach; Connexin31 in Fibroblasten und Endothel der Dermis nachweisbar, nicht in den epidermalen Zellen.



Fig.36: Cx31, Hühnerembryo 19. Entwicklungstag, Stadium 45 HH, Objektivergrößerung 10fach; Übersicht über die Anordnung der Federmuskulatur in der Hypodermis mit Connexin31 Nachweis.

6.1.4. Connexin32

Haut

Connexin32 ist während der Entwicklung der Haut des Hühnchens in unterschiedlichen Expressionsmustern nachweisbar. So zeigen in den frühen Entwicklungsphasen, wie dem 4. und 5. Entwicklungstag (Stadium 23 – 27 HH) im gesamten Embryo, die mesenchymalen Zellen und die lateralen Zellverbindungen im Periderm eine Expression. Ab dem 6. Entwicklungstag (Stadium 28/29 HH) liegt eine minimale Expression in den lateralen Zellgrenzen des Stratum basale und eine vermehrte Expression in den Mesenchymzellen vor. Ab dem 7. Entwicklungstag (Stadium 30 - 32 HH) ist das Connexin noch vereinzelt im Stratum basale vorhanden. Ab dem 8. Entwicklungstag (Stadium 33/34 HH) findet sich eine zunehmende Expression im Stratum basale, dafür weit weniger im Mesenchym, dort zeigt sich deutlich eine Expression in den Zellwänden der Erythrozyten und auch in der Plasmamembran der Endothelzellen der sich bildenden Gefäßwände. In der weiteren Entwicklung der Haut erkennt man immer deutlicher die vermehrte Expression in den sich entwickelnden Epithelschichten, vor allem im Stratum basale und im Stratum intermedium. Im

Mesenchym ist, je nach Entwicklungszeitraum, in verschiedenen Zellzusammenschlüssen Connexin32 nachweisbar. Während des 14. Entwicklungstages (Stadium 40 HH) wird eine zunehmende Bildung von Connexin32 in bestimmten Zellgruppierungen der Dermis deutlich, so z.B. in den Federmuskelzellen. Am 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) erkennt man sehr gut einen Unterschied in der Expression von Connexin32 in den Zellen der Epidermis und den Zellen der Dermis. So tritt eine deutliche Connexinexpression in den sich langsam formenden Zellen des Stratum corneums und auch verstärkt in den Zellen des Stratum intermediums auf, als Hinweis auf eine zunehmende Ausdifferenzierung der Zellen zu Keratinozyten; dagegen nur noch vereinzelt im Stratum basale. In der Dermis und der Hypodermis beschränkt sich eine verstärkte Expression auf die Endothelzellen der Blutgefäße.



Fig.37: Cx32, Hühnerembryo 8. Entwicklungstag, Stadium 33/34 HH, Objektivergrößerung 40fach; Connexin32 im Bereich des Stratum basale und des Periderms, am rechten Bildrand auch in den Erythrozyten erkennbar.

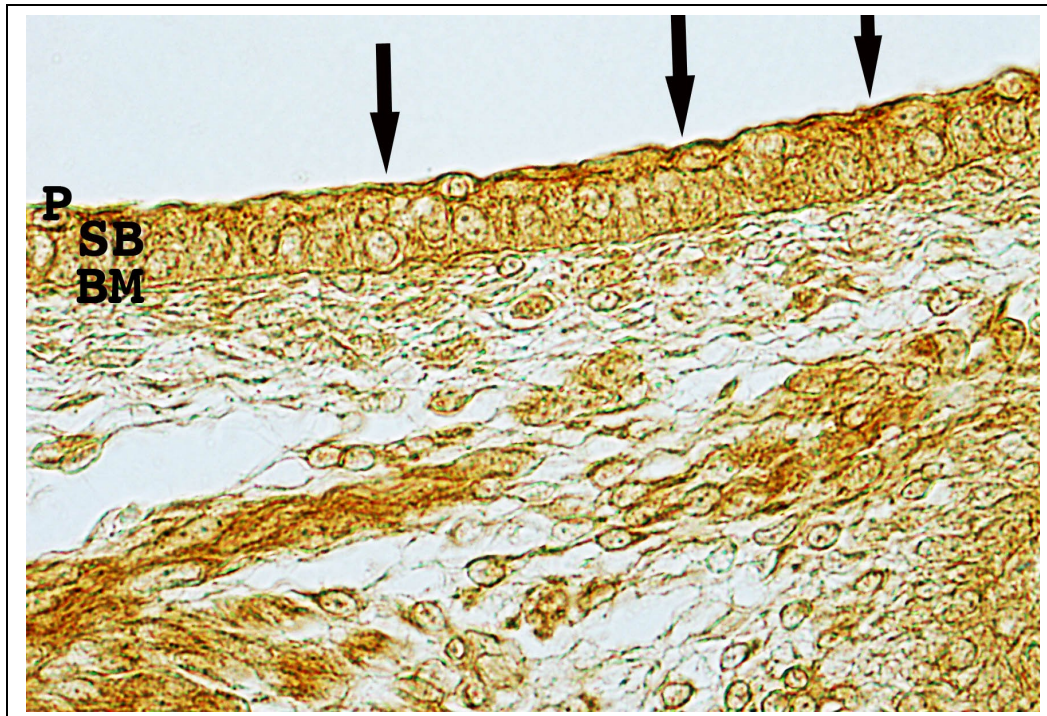


Fig.38: Cx32, Hühnerembryo 14. Entwicklungstag, Stadium 40 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin32 in den epidermalen Zellen und teilweise in dermalen Zellen, die noch nicht ausdifferenziert sind.

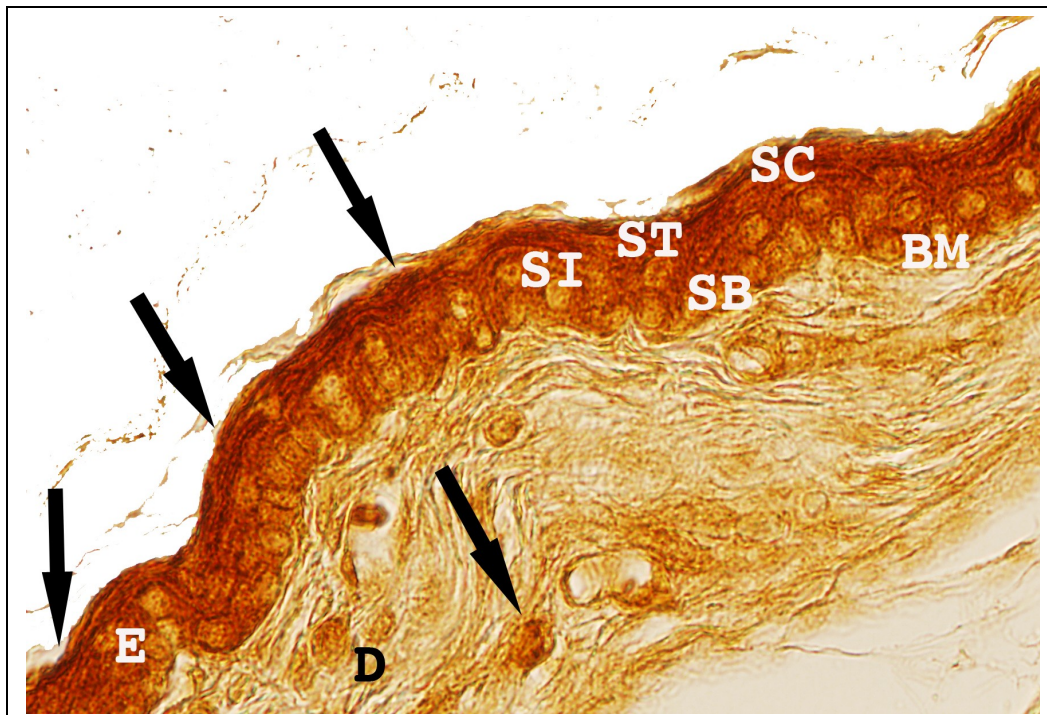


Fig.39: Cx32, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin32 eindeutig vor allem in den Zellen des Stratum transivum und des Stratum corneum der Epidermis.

Federfollikel

Ab dem 10. Entwicklungstag (Stadium 36 HH) ist Connexin32 im oberen Bereich der mesenchymalen Verdichtungen zwischen den Fibroblasten dicht unterhalb der epidermalen Zellschichten nachweisbar. Auch im Stratum basale und im Periderm findet man das Connexin. In den sich neu bildenden Zellschichten des Stratum intermediums sieht man an den lateralen Zellgrenzen eine deutliche Reaktionsanfärbung für Connexin32. Ab dem 11. Entwicklungstag (Stadium 37 HH) ist weiterhin eine vermehrte Expression im basalen Bereich des Stratum basales deutlich, wobei im Besonderen die sich verdichtenden Fibroblasten der Dermis eine erhöhte Expression aufweisen. Zudem zeigt das sich bildende Endothel der Blutgefäße eine Expression von Connexin32. In den weiteren Entwicklungsstadien ist, wie bei der Entwicklung der Haut, Connexin32 in den oberen epidermalen Schichten nachzuweisen. So ist es ab dem 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) eindeutig in dem sich langsam formenden Stratum corneum und in den oberen Schichten des Stratum intermediums erkennbar. Dieses wird auch in den oberen Schichten der epidermalen Zellen des Federfollikels deutlich. In der Dermis und Hypodermis ist das Connexin nur noch in bestimmten Zellen zu finden, so in den Federmuskelzellen und den Endothelzellen der Blutgefäße.

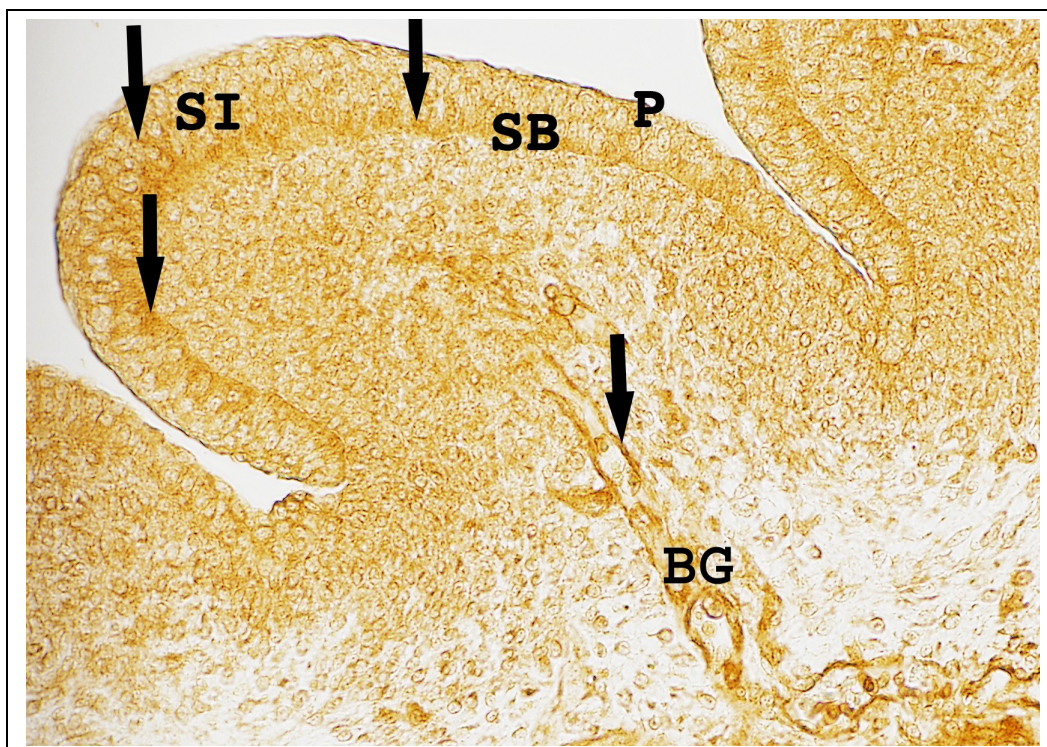


Fig.40: Cx32, Hühnerembryo 11. Entwicklungstag, Stadium 37 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Connexin32 in den Zellen des Stratum intermediums, Stratum basales und den Endothelzellen.

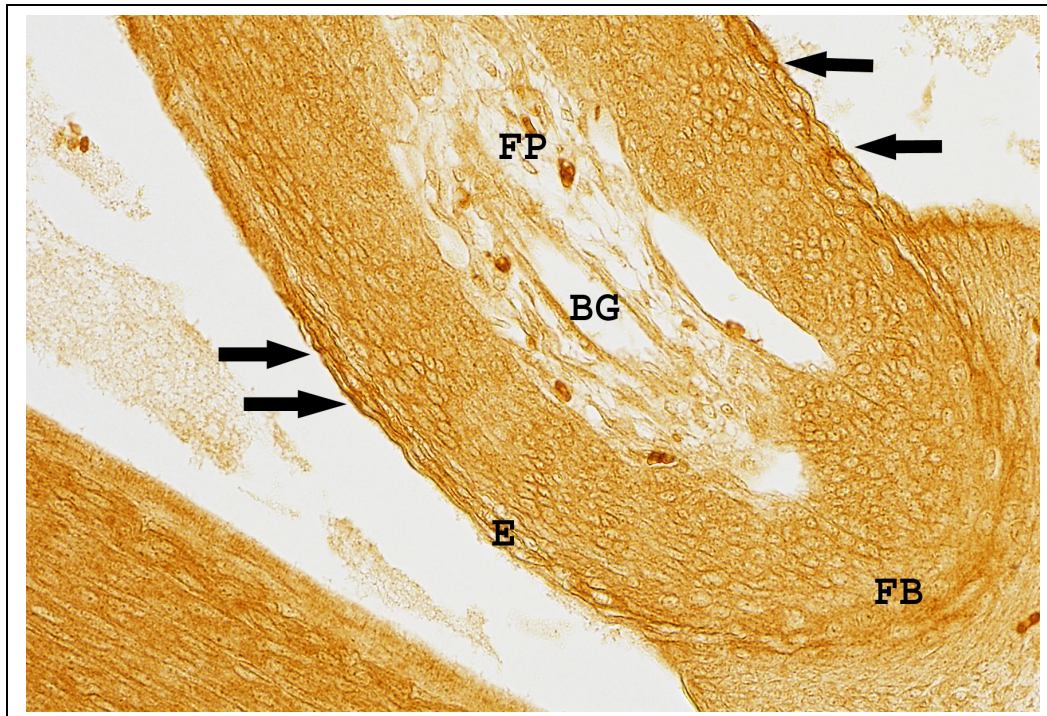


Fig.41: Cx32, Hühnerembryo 15. Entwicklungstag, Stadium 41 HH, Objektivergrößerung 20fach; Connexin32 in den Zellen der Federbasis und der Epidermis.

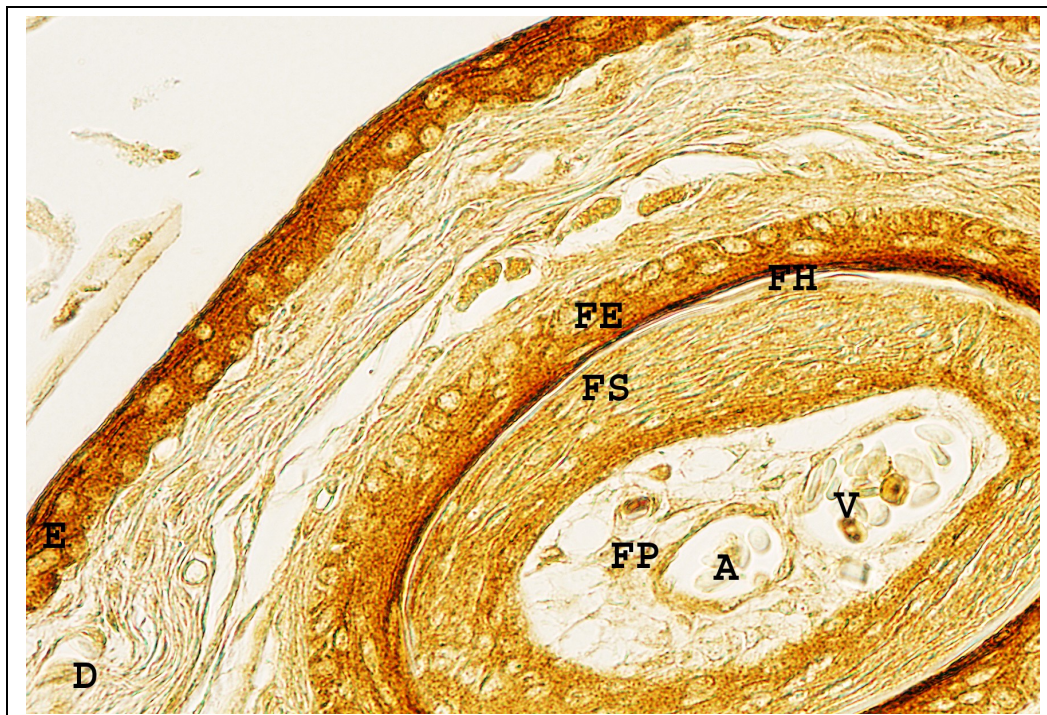


Fig.42: Cx32, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivergrößerung 40fach; Connexin32 in den epidermalen Zellen der Epidermis und auch des Follikelepithels.

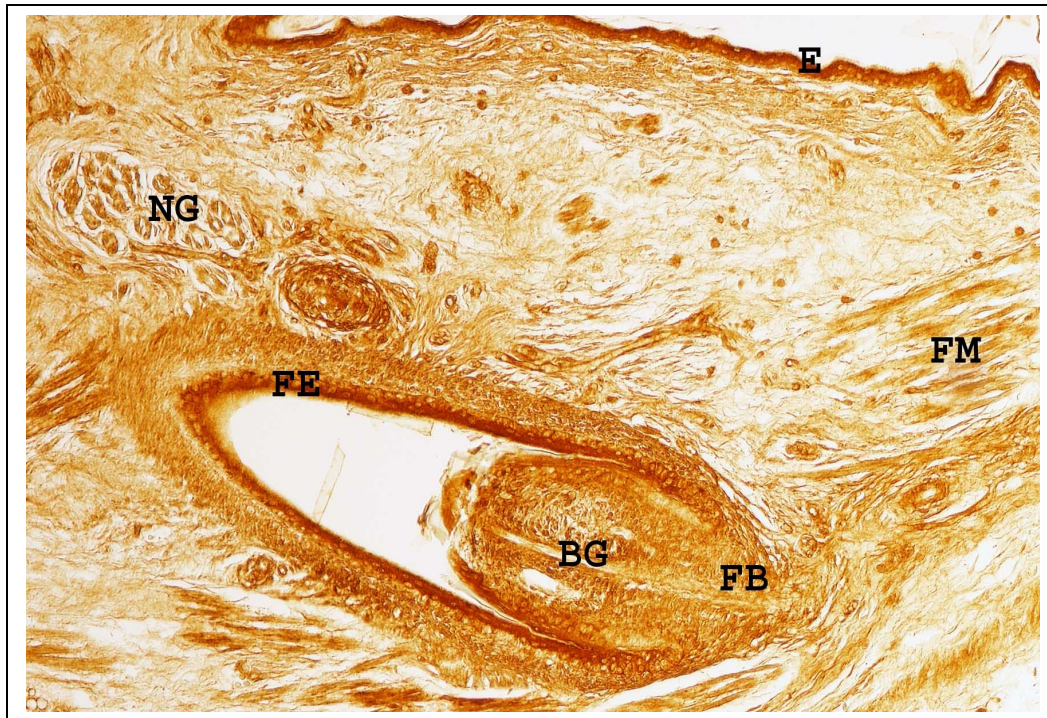


Fig.43: Cx32, Hühnerembryo 19. Entwicklungstag, Stadium 45 HH, Objektivvergrößerung 10fach; Übersicht eines Federfollikels in der Hypodermis liegend, Connexin32 in den Schichten der Epidermis, in der Federmuskulatur und dem Nervengewebe.

6.1.5. Connexin43

Haut

Connexin43 lässt sich während der gesamten Entwicklung in allen Hautschichten finden. Vor allem in den verschiedenen epidermalen Schichten kann es während jeder Entwicklungsstufe auftreten. Vom 4. bis zum 8. Entwicklungstag (Stadium 23 – 34 HH) lässt sich Connexin43 vor allem in den basalen Abschnitten der Stratum basale-Zellen darstellen, wodurch die Basalmembran auch bei kleinen Vergrößerungen als kräftige Struktur sichtbar wird. Ab dem 8. Entwicklungstag (Stadium 33/34 HH) ist die Basalmembran nicht mehr ganz so klar abgrenzbar. Dafür wird das Periderm als eine Lage deutlich, in deren lateralen Zellgrenzen das Connexin auftritt. Ab dem 10. Entwicklungstag (Stadium 36 HH) kann man es zudem in epidermalen Verdichtungen finden, wo die Epidermis dicker wird und sich ein deutliches Stratum intermedium zeigt. In den mesenchymalen Verdichtungen der beginnenden Federentwicklung ist Connexin43 auch vermehrt in den Fibroblasten nachweisbar. Im weiteren Verlauf der Entwicklung zeigt sich eine Abgrenzung hin zu den endothelialen Zellen der Blutgefäße und den Zellen der Federmuskulatur. Ab dem 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) kann man eine deutliche Expressionsverteilung zwischen epidermalen und dermalen

Zellen erkennen. So ist ein Nachweis vermehrt in den epidermalen Zellen sichtbar, wobei auffällt, dass die jetzt ausdifferenzierten Keratinozyten des Stratum corneums keine Expression von Connexin43 mehr zeigen.

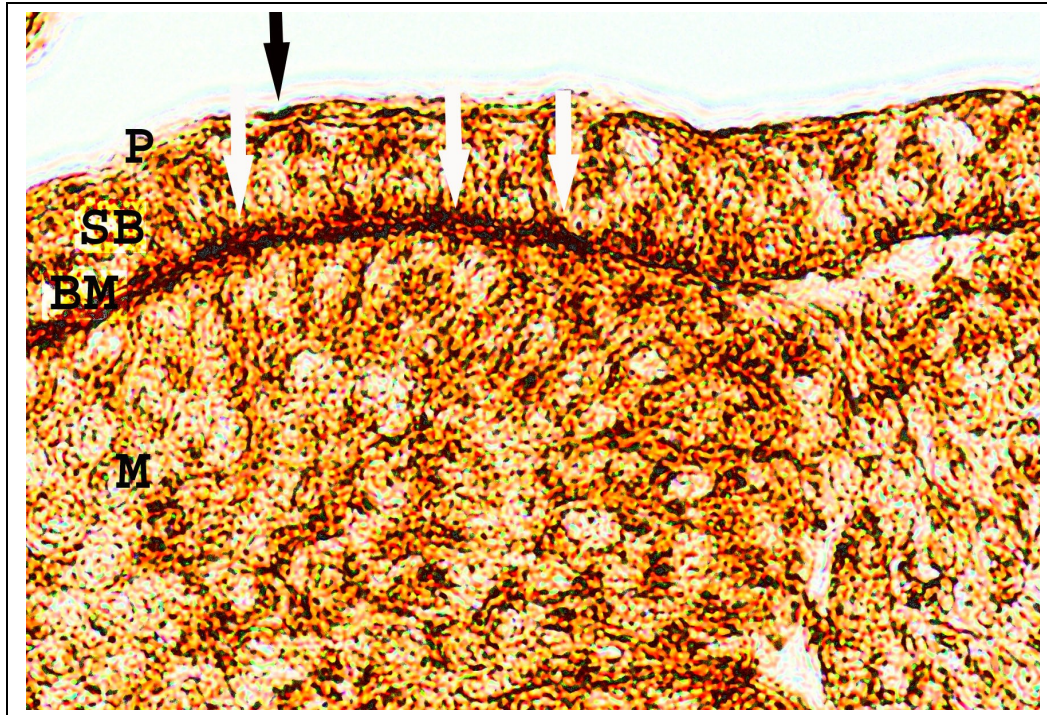


Fig.44: Cx43; Hühnerembryo 5. Entwicklungstag, Stadium 25 - 27 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin43 vor allem im Bereich der Basalmembran.

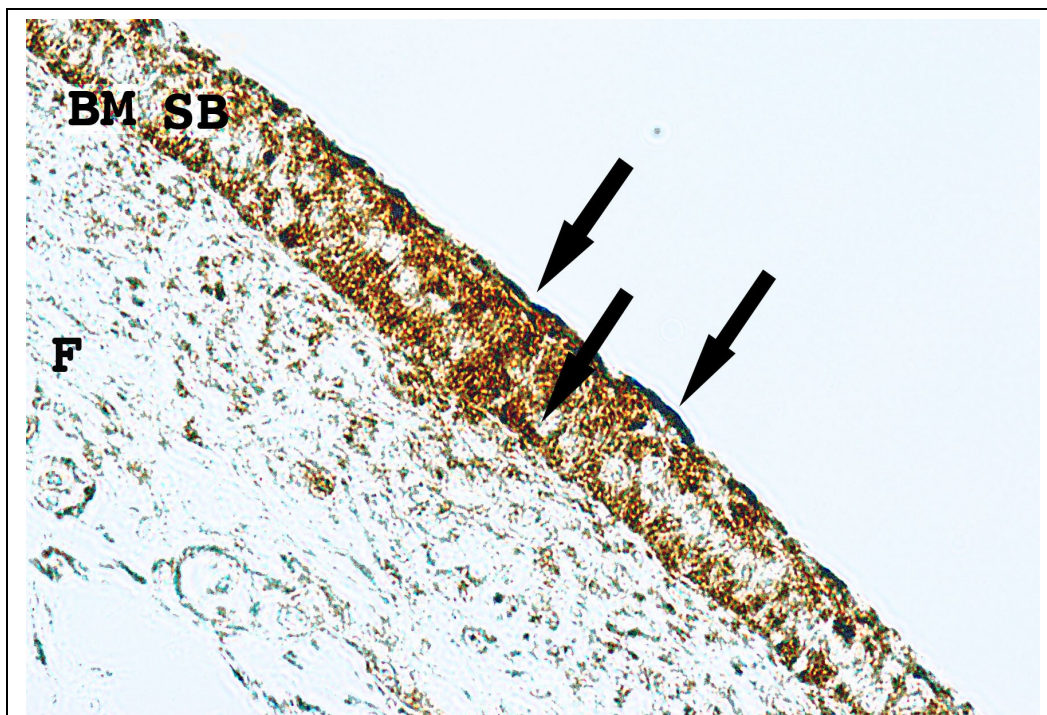


Fig.45: Cx43, Hühnerembryo 10. Entwicklungstag, Stadium 36 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin43 im Bereich der epidermalen Zellen.

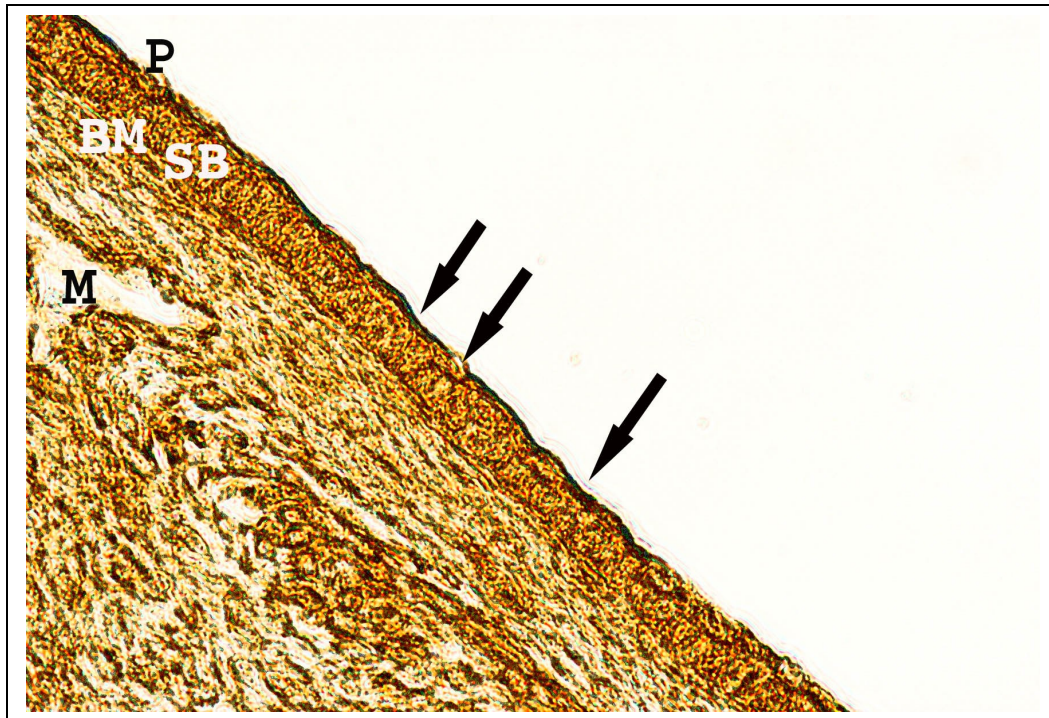


Fig.46: Cx43, Hühnerembryo 13. Entwicklungstag, Stadium 39 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin43 v.a. im Bereich des Periderms und bei den sich vermehrenden Zellen im Mesenchym.

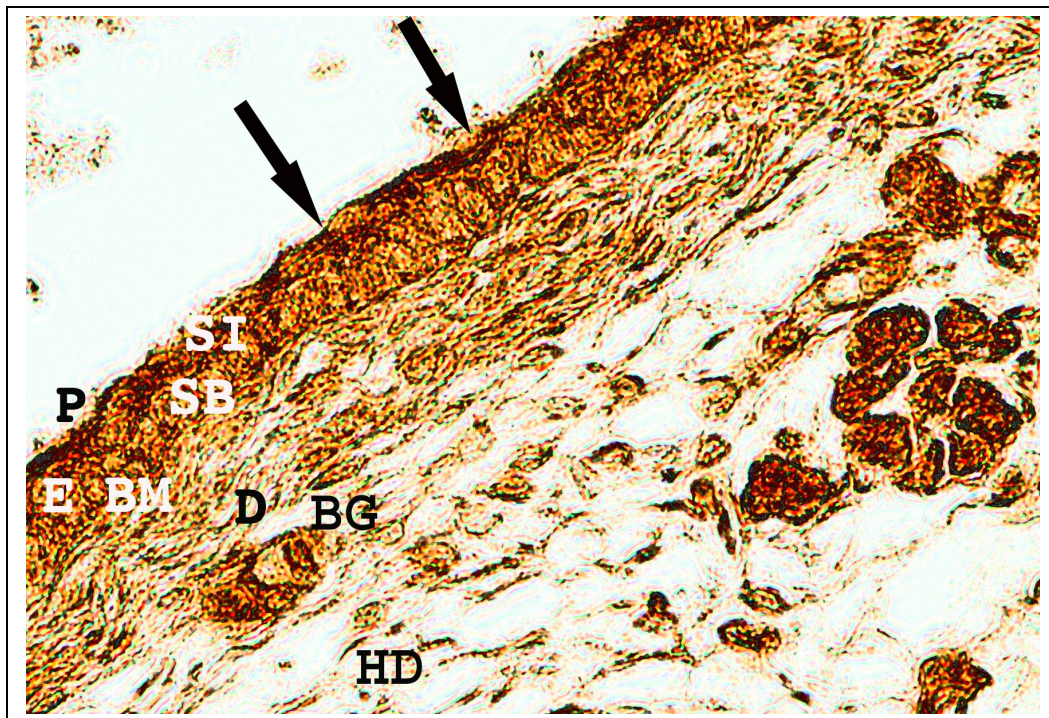


Fig.47: Cx43, Hühnerembryo 15. Entwicklungstag, Stadium 41 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin43 vor allem im Periderm und im Stratum intermedium und auch in Zellen in den Blutgefäßen und in sich weiter differenzierenden Zellen der Hypodermis.

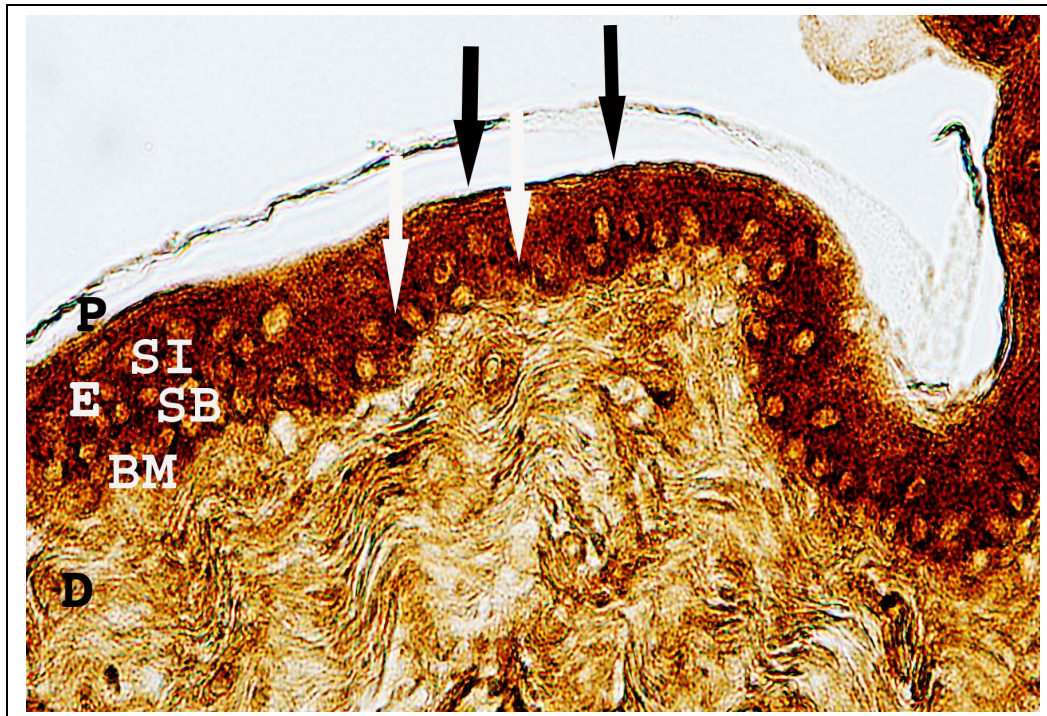


Fig.48: Cx43, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin43 in allen Schichten der Epidermis nachweisbar.

Federfollikel

In den mesenchymalen Verdichtungen unterhalb der epidermalen Verdichtungen, d.h. den Zeichen des Beginns der Federentwicklung, lässt sich Connexin43 deutlich nachweisen. Auch in den Endothelzellen der Gefäße der Dermis erkennt man Connexin43, so dass eine Gefäßeinsprossung in die Federpapille klar sichtbar wird. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt Connexin43 in der Dermis und in allen Schichten der Epidermis vor. Ab dem 11. Entwicklungstag (Stadium 37 HH) wird Connexin43 vor allen in den epidermalen Schichten synthetisiert, die an der Federbildung teilnehmen. Weiterhin zeigen sich eindeutige Nachweise im proliferierenden Bereich des Stratum basale zur Basalmembran hin. Auch im Endothel der Gefäße der Dermis ist das Connexin weiterhin anfärbbar. Während der Bildung der Radiogenstränge aus epithelialen Zellen fallen Connexin43 Nachweise auch in diesen Zellen positiv aus. Ab dem 15. Entwicklungstag (Stadium 41 HH) kann man das Connexin ebenfalls in der Federmuskulatur finden, die tief in der Dermis bzw. Hypodermis entsteht und die einzelnen Federfollikel miteinander verbindet. In den Federn ist in den Zellen, die aus epidermalen Anteilen entstehen, zudem deutlich ein Connexin43-Nachweis möglich. Ab dem 17. Entwicklungstag (Stadium 43 HH) lässt sich das Connexin nur noch in den sich weiter proliferierenden und noch nicht endgültig

ausdifferenzierten epithelialen Zellen finden. So sind klare Nachweise in den Zellen des Stratum basales und des Stratum intermediums der Epidermis erkennbar, aber nicht mehr im Stratum corneum, das aus ausdifferenzierten Keratinozyten besteht. Auch zeigen sich noch positive Nachweise im Follikelepithel und in den basalen Zellen der Federspule, aber nicht mehr in den am Rande liegenden ausdifferenzierten Zellen der Federspule. Zusätzlich sind immer noch positive Nachweise im Gefäßendothel möglich.

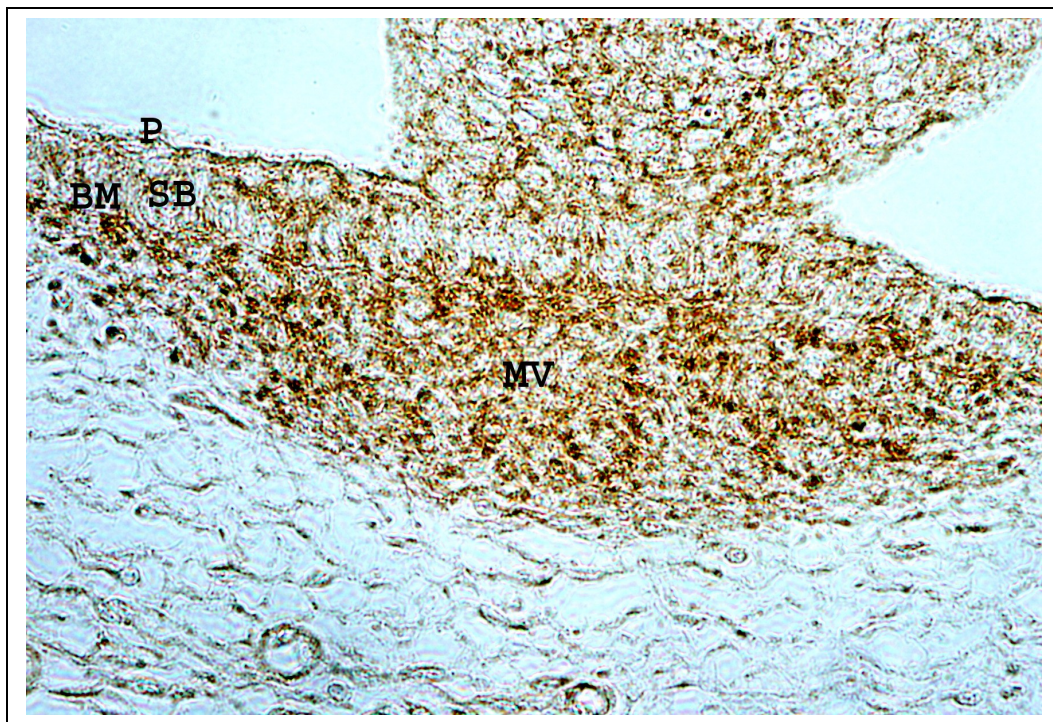


Fig.49: Cx43, Hühnerembryo 10. Entwicklungstag, Stadium 36 HH, Objektivergrößerung 40fach; Connexin43 in den mesenchymalen Verdichtungen und den Zellen der Epidermis.



Fig.50: Cx43, Hühnerembryo 11. Entwicklungstag, Stadium 37 HH, Objektivvergrößerung 20fach; Connexin43 in den epidermalen Zellen und den proliferierenden Zellen der Federpapille, sowie den Endothelzellen der Blutgefäße.



Fig.51: Cx43, Hühnerembryo 13. Entwicklungstag, Stadium 39 HH, Objektivvergrößerung 10fach; Connexin43 in den epidermalen Zellen der Haut und der Feder.

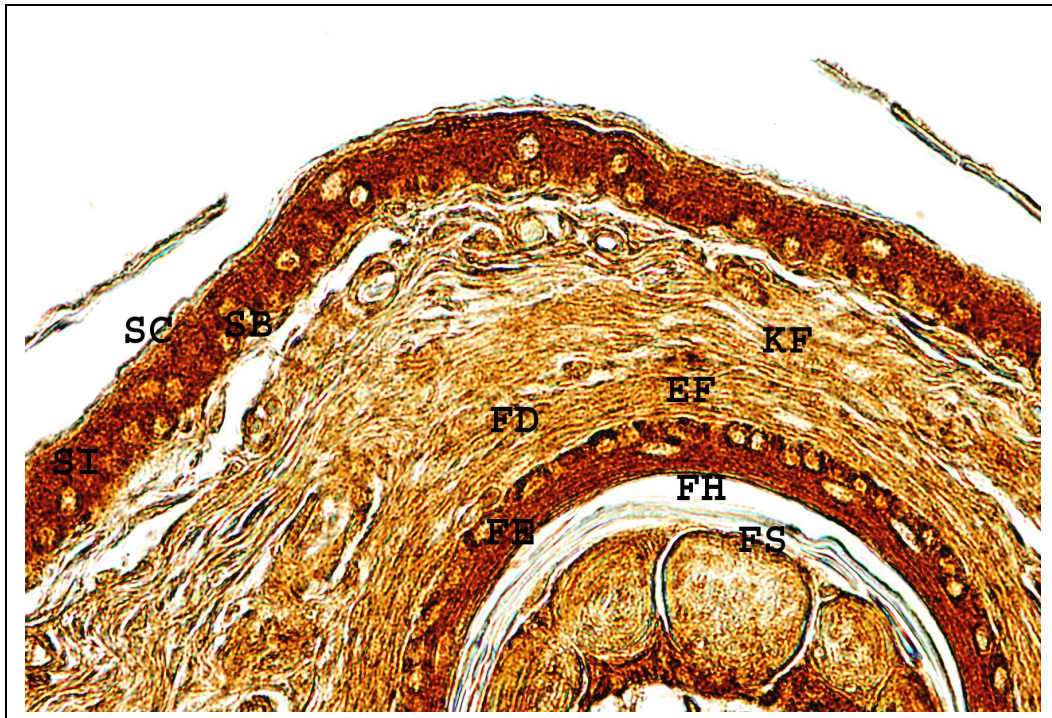


Fig.52: Cx43, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Connexin43 nur in den Epidermiszellen

6.1.6. Connexin45

Connexin45 konnte mittels immunhistochemischer Methodik in keinem Entwicklungsstadium der Haut oder des Federfollikels beim Hühnchen nachgewiesen werden.

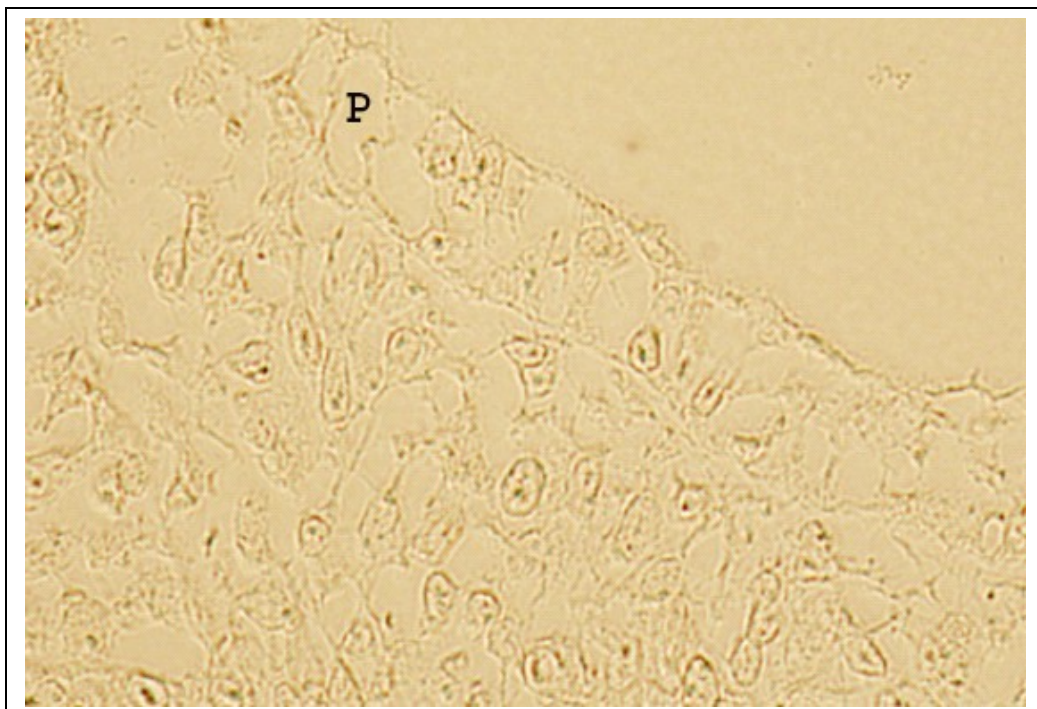


Fig.53: Cx45, Hühnerembryo 4. Entwicklungstag, Stadium 23/24, Objektivvergrößerung 40fach; Kein Nachweis erkennbar.

6.1.7. Ergebnisse / Tabellen

Tab.5 : Connexinexpression in den sich entwickelnden Hautschichten

(E) = im Embryo, (lat) = laterale (seitliche) Zellgrenzen, (*) = an der unteren Zellgrenze der Basalmembran zum Mesenchym hin

Epidermis		Cx26	Cx30	Cx31	Cx32	Cx43	
	Str. corneum	(+)			++		
	Periderm	+	+		+ (bis St. 29)		
	Str. transitivum	(+)			+		
	Str. intermedium	++	++	+ (lat)	+	++	
	Str. basale	++	+ (E)			++ (E)	
Basalmembran				++ (*) (E)		++ (E)	

Tab. 6: Connexinexpression in sich entwickelndem Federfollikel

Connexine im Bereich der Federfollikel während der embryonalen Entwicklung vom 4. Entwicklungstag bis zum 19. Entwicklungstag, kurz vor dem Schlupf (Stadium 23 bis 45 HH)

Dermale Zellen		Cx26	Cx30	Cx31	Cx32	Cx43
	Fibroblasten	+	++	++	++	+
	Endothel	+	+	+	++	+
	Federmuskulatur	+	+	+		+

6.2. Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung

Mit der In-situ-Hybridisierung wird die spezifische mRNA ausgewählter Connexine in der Zelle nachgewiesen, als Bestätigung der vorangegangenen Nachweise in der Immunhistochemie.

In dieser Arbeit wurde für das Cx26, Cx30 und Cx32 die In-situ-Hybridisierung durchgeführt. Bei allen drei Connexinen bestätigte sich der Nachweis der Connexine durch Immunhistochemie in der In-situ-Hybridisierung.

Bei den jüngeren Stadien war eine stärkere unspezifische Umgebungsreaktion erkennbar, die bei zunehmender Differenzierung der Zellen geringer wurde. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Immunhistochemie. So nimmt die Expression des Cx26 im Laufe der Entwicklung in den verschiedenen Bereichen, vor allem im Stratum basale und Stratum intermedium zu. Auch während der Entwicklung des Federfollikels bestätigt sich die Cx26 Expression in den mesenchymalen Verdichtungen. Um die Expression von Cx26 in ausgereiften Keratinozyten des Stratum transitivums und Stratum corneums mittels In-situ-Hybridisierung zu bestätigen, wurde diese an adulter Hühnerhaut durchgeführt (Fig.54). Dort zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz in diesen Zellschichten.

Die Bestätigung der Cx30 Expression in den epidermalen Zellen der sich entwickelnden Haut und auch der epidermalen Zellen der Federfollikel ließ sich mittels Nachweis der spezifischen mRNA durch die In-situ-Hybridisierung zeigen. Das entsprechende Ergebnis der Fluoreszenz gleicht dem der Immunhistochemie für das Cx30 (Fig.55 und 56).

Die nachgewiesene mRNA vom Cx32 gleicht grundsätzlich dem Ergebnis der Immunhistochemie. So lässt sich deutlich die Fluoreszenz in den epidermalen Zellen und in den Endothelzellen der dermalen Blutgefäße erkennen, und zwar bei der sich entwickelnden Haut und auch während der Entwicklung der Federfollikel (Fig.57).

Auffallend bei allen durchgeführten In-situ-Hybridisierungen ist die starke Eigenfluoreszenz der Erythrozyten in den Blutgefäßen, die auf ihre Eisenbeladung zurückzuführen ist. Auch die vollständig ausdifferenzierten abgeschilferten Keratinozyten des Stratum corneums beim adulten Hühnchen zeigen eine deutliche Eigenfluoreszenz, möglicherweise aufgrund des hohen α -Keratin Anteils in ausdifferenzierten Keratinozyten, da eine vorhandene m-RNA aufgrund einer fehlenden Biosynthese in diesen Zellen nicht mehr möglich scheint. Die IsH wurde in dieser Arbeit

mit der Sense- und der Antisense-Sonde durchgeführt. Die Sense-Sonden Ergebnisse können so als Negativkontrolle bewertet werden. Mit der Dokumentation der Sense-Sonden Ergebnisse kann man eindeutig die Eigenfluoreszenz der Erythrozyten erkennen (Fig.58, hier exemplarisch für Cx32). Die Haut dagegen ist nur schemenhaft im Hintergrund erkennbar, zeigt somit nur eine minimale Eigenfluoreszenz. Zusätzlich wurden noch unbehandelte Schnitte, Leerschnitte, auf Eigenfluoreszenz getestet, die ähnliche Resultate zeigten.

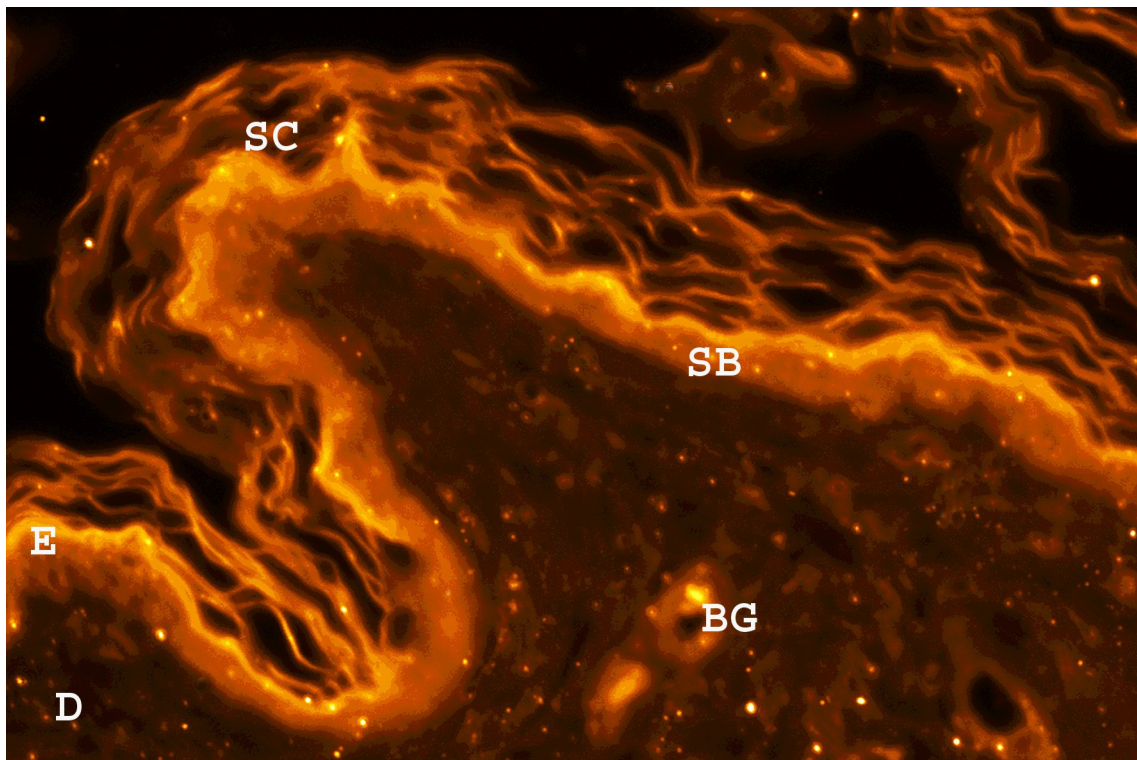


Fig.54: Cx26, Adulte Hühnerhaut, Objektivvergrößerung 20fach; Nachweis in den Zellen der Epidermis (E), Eigenfluoreszenz der Erythrozyten in den Blutgefäßen (BG) und den ausdifferenzierten abgeschilfert Keratinozyten des Stratum corneums (SC).

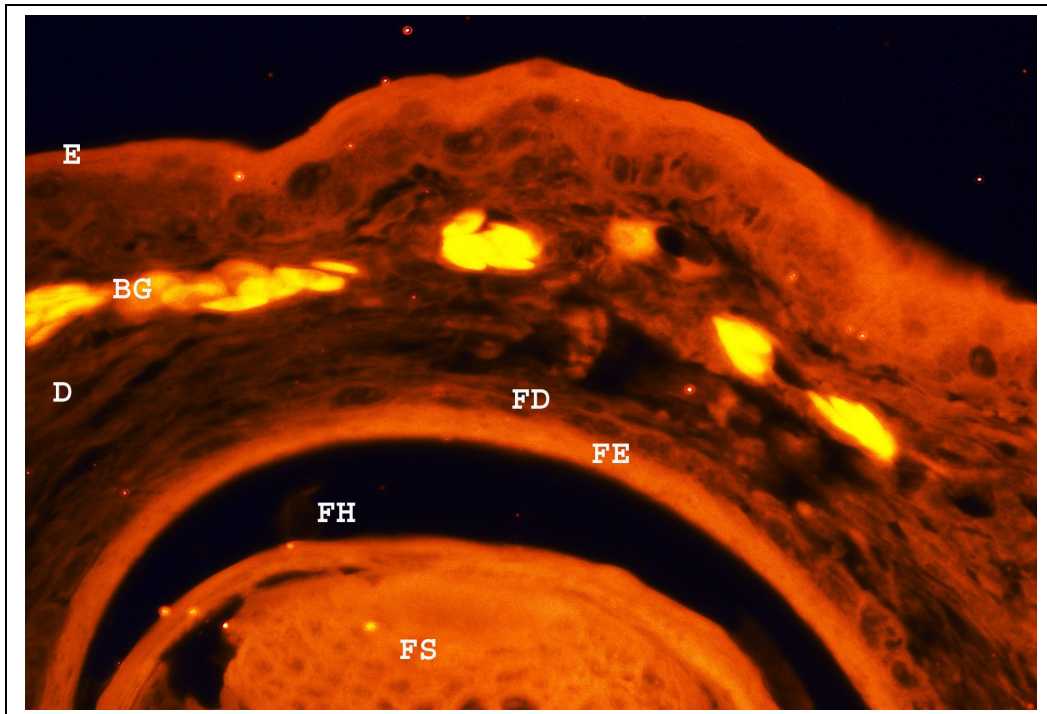


Fig.55: Cx30, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Nachweis der mRNA über die immunfluoreszierenden Sonden in den Zellen, der Epidermis (E), des Follikelepithels (FE) und der Federspule (FS), nicht mehr in den Zellen der Dermis (D), Eigenfluoreszenz der Erythrozyten in den Blutgefäßen (BG).

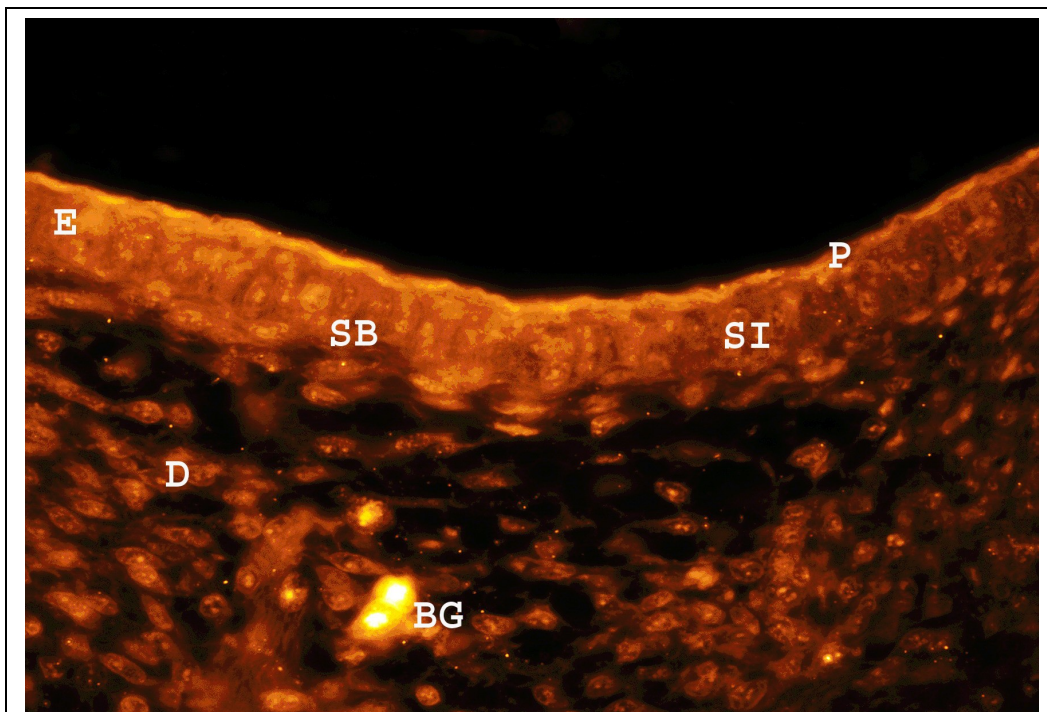


Fig.56: Cx30, Hühnerembryo 11. Entwicklungstag, Stadium 37 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Vor allem im Stratum Intermedium (SI) der Epidermis ist eine deutliche Reaktion nachweisbar, entsprechend der Ergebnisse der Immunhistochemie, deutliche Eigenfluoreszenz der Erythrozyten in den Blutgefäßen (BG) der Dermis.

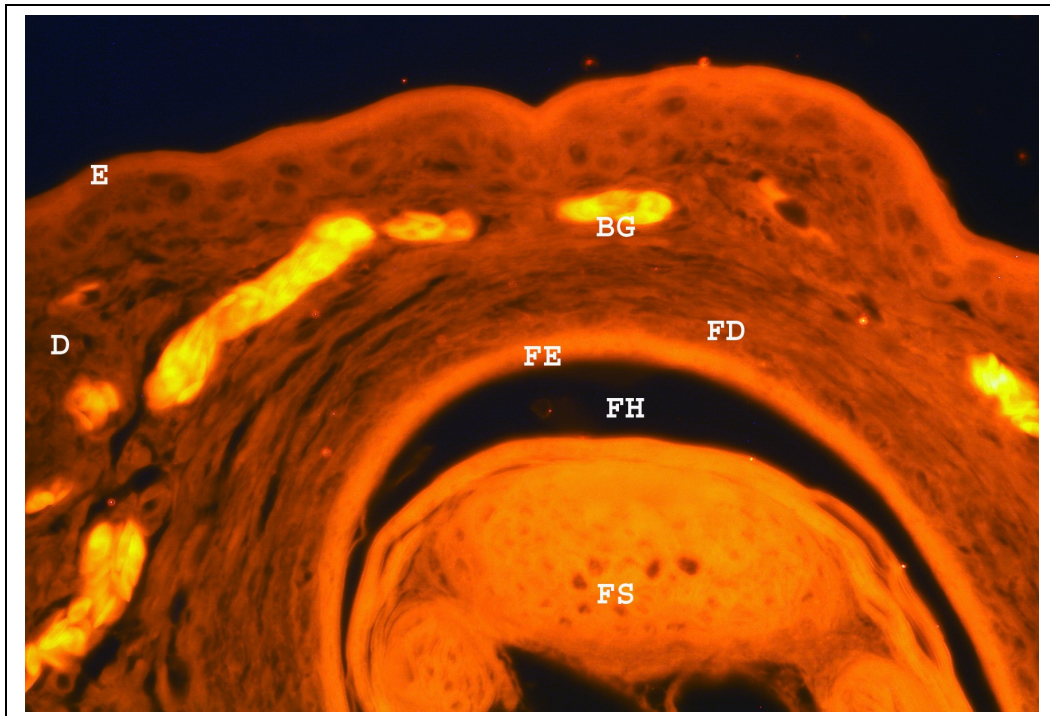


Fig.57: Cx32, Hühnerembryo 17. Entwicklungstag, Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Nicht nur die Zellen der Epidermis (E) zeigen eine positive Reaktion, auch die Zellen der Dermis (D); Eigenfluoreszenz der Erythrozyten in den Blutgefäßen (BG).

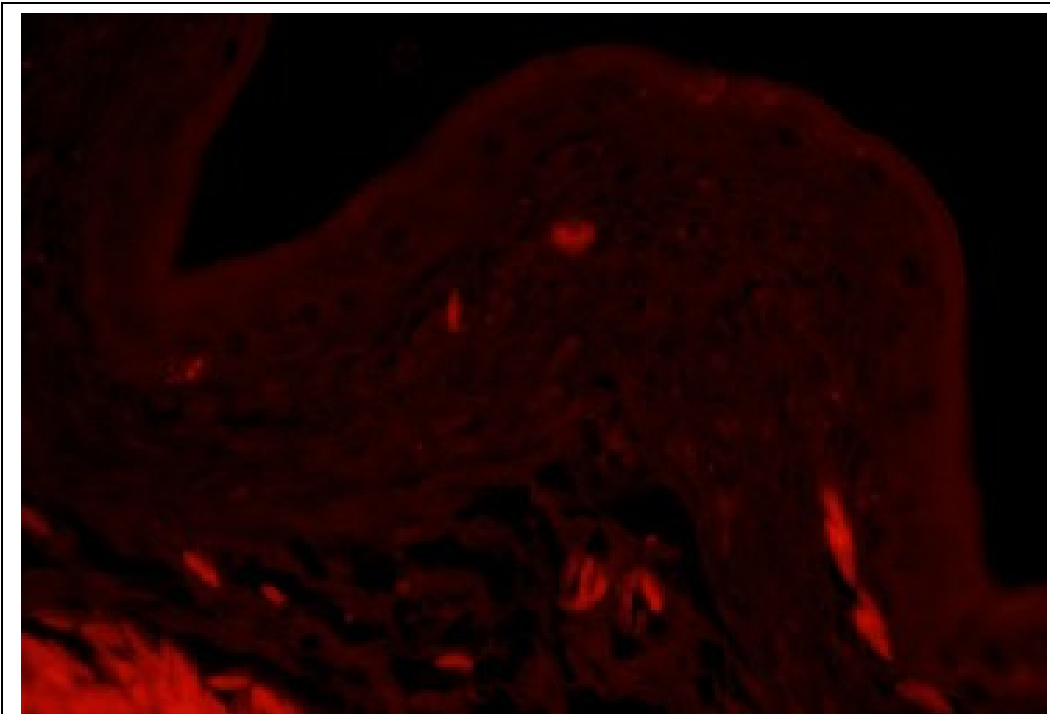


Fig.58: Negativkontrolle mit einer Sense-Sonde des Cx32, 17. Entwicklungstag; Stadium 43 HH, Objektivvergrößerung 40fach; Die abgrenzbare Epithelschicht nach außen lässt sich nur erahnen, bei einer deutlichen Eigenfluoreszenz der Erythrozyten.

7. Diskussion

7.1. Kritische Betrachtung der Methodik

Zur Erhaltung einer guten Zellmorphologie und der Antigene mit guter Epitopzugänglichkeit muss auf eine entsprechende Fixierungsqualität geachtet werden. Bei einer Überfixation, die vor allem mit Formalin beobachtet werden kann, kann es zu einer Maskierung der Antigene kommen. Bei Formalin geschieht dies durch vermehrte Aldehydverbindungen. Aber auch eine strukturelle Veränderung der Proteine, z.B. durch Denaturierung ist denkbar. Dieses kann durch eine erhöhte Temperatur, aber auch durch bestimmte Fixierungsgemische ausgelöst werden. Aufgrund der guten Permeationscharakteristika und gleichzeitig bekannten guten Erhaltung der Proteine und damit der Antigenität (s. Übersicht bei HORNICKEL et al., 2011), entschieden wir uns in der vorliegenden Arbeit, das Bouin'sche Fixierungsgemisch zu benutzen. Diese bewährte Lösung hat besonders bei einem so empfindlichen Gewebe wie demjenigen eines Embryos große Vorteile (BÖCK, 1989; HORNICKEL et al., 2011).

Um die Nachweise so spezifisch wie möglich zu erhalten, muss weiterhin darauf geachtet werden, dass die vorhandenen Antigene auch nach dem Schneiden noch von den spezifischen Antikörpern erkannt werden, ohne diese zu zerstören oder zu verändern. Bei einer Paraffineinbettung ist das gut möglich. Paraffin ist leicht und vollständig aus dem Gewebe herauszulösen, so dass keinerlei Rückstände die Ergebnisse verändern können.

So wurden die Übersichtsfärbung, die Immunhistochemie und die In-situ-Hybridisierung anhand von Paraffinschnitten durchgeführt. Kunststoffschnitte, wie zum Beispiel Technovit, lassen bei vergleichsweise dünneren Schnitten oft genauere und auch schärfere Zellgrenzen erkennen, als bei Paraffin, doch zeigt sich des Öfteren eine unspezifische Hintergrundfärbung oder eine Abschwächung der spezifischen Färbung, da der Kunststoff nicht vollständig aus dem Gewebe entfernt werden kann. Gleichzeitig ist beim Herstellen der Schneideblöcke eine relativ hohe Temperatur notwendig, die einerseits die im Gewebe vorhandenen und teilweise noch nachzuweisenden Proteine denaturieren und sie damit für eine Antikörpererkennung unsichtbar machen kann, oder aber zu einer Bildung von Polymeren des Kunststoffes führt, die dann für eine erhöhte Hintergrundfärbung verantwortlich ist. Dadurch werden die Nachweise nur schwer

auswertbar. Aus diesen Gründen wurde anhand von Technovitschnitten lediglich eine Übersichtsfärbung durchgeführt.

Auf die Schwierigkeit der Dokumentation v.a. der Connexinnachweise der IsH an den Paraffinschnitten wurde schon im Einleitungsteil der Ergebnisse hingewiesen, was speziell für sehr kleine Proben gilt, wie z.B. von Embryonen mit einer Gesamtlänge von max. 2,5 cm am 4.ET (KEIBEL und ABRAHAM, 1900). Bezieht man noch das sehr feine Gewebe ein, so ist es sehr schwierig, aufgrund der sehr geringen Mengen und auch der sehr empfindlichen Strukturen die Connexine nachzuweisen. Über die HRP-DAB-Methodik mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie wurde versucht, die Ergebnisse deutlicher darzustellen (MEYER et al., 1984).

Aufgrund der Einheitlichkeit der Connexine und der Homologie der Connexine zu anderen Spezies ist es möglich, Antikörper in der Immunhistochemie zu verwenden, die nicht Hühnchen-spezifisch sind. In dieser Arbeit wurden Antikörper benutzt, die ihre Immunität aus dem Kaninchen oder der Maus hatten. Um eine möglichst eindeutige und auch vergleichbare Reaktion der Nachweise zu bekommen, wurden Positivkontrollen mitgeführt, wie zum Beispiel Schnitte von der Haut der Maus für den Nachweis der Spezifität des Cx30 Antikörpers. Zum Ausschluss unspezifischer Hintergrundfärbung des Materials wurden Leerpräparate mitgeführt und auch Negativkontrollen, um unspezifische Reaktionen auszuschließen bzw. beim Auftreten richtig interpretieren zu können. Bei der Darstellung der Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung wurden Leerschnitte auf Eigenfluoreszenz untersucht, um dieses Phänomen bei der Auswertung zu berücksichtigen. Gleichzeitig wurden bei der IsH die Proben auch mit der vorher hergestellten Sense-Sonde durchgeführt. Da diese Sonde die gleiche Basenfolge wie die gesuchte mRNA führt, sind diese Nachweise mit Negativkontrollen gleichzusetzen. Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die Eigenfluoreszenz der Erythrozyten weiterhin deutlich war, aber die Haut an sich nur eine schemenhafte Eigenfluoreszenz als unspezifische Hintergrundfärbung aufwies (vgl. Fig. 58). Die deutliche Eigenfluoreszenz der Erythrozyten lässt sich am ehesten auf deren Eisenanteil zurückführen. Auch das Stratum corneum der adulten Tiere zeigt eine deutliche Eigenfluoreszenz, die wahrscheinlich auf den Anteil von α -Keratin in ausdifferenzierten Keratinozyten zurückzuführen ist. Ein positiver mRNA Nachweis wäre in diesen Zellen aufgrund einer fehlenden Biosynthese nicht wahrscheinlich.

Schwierigkeiten kann es beim Vermeiden möglicher Kreuzreaktionen geben. So haben KUMAR und GILULA (1996) eine fixierungsbedingte Kreuzreaktion von Cx26 mit Cx30

beschrieben. Um diese auszuschließen, wurden die gesamten immunhistochemischen Nachweise an völlig gleich fixierten, eingebetteten und geschnittenen Proben durchgeführt.

Es ist trotz teilweise unterschiedlicher Intensität der einzelnen Nachweise der Connexine keine eindeutige Aussage über die Expressionsstärke anhand der Immunhistochemie möglich. Auch ist kein zweifelsfreier Rückschluss auf die Proteinmenge zu führen, da die Reaktionsintensität sehr stark variierte. Dies könnte direkt an der unterschiedlichen Proteinmenge liegen, aber auch an der unterschiedlichen Affinität der Antikörper an die Connexine, so dass lediglich eine Aussage über den positiven oder negativen Nachweis möglich war, gerade wenn man die einzelnen immunhistochemischen Nachweise mit den mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen vergleicht. Weiterhin ist nicht bekannt, wie viele Connexine genau in einem Gap junction-Plaques, gerade in einem Embryo vorhanden sind, so dass man nicht sicher von der Intensität der Nachweise auf die Anzahl der Connexine schließen kann.

7.2. Kritische Betrachtung der Ergebnisse

7.2.1. Gap Junctions und das Integument

Die Gap Junctions spielen während der Differenzierung der Keratinozyten eine große Rolle. Es zeigt sich eine Änderung in der Expression von Gap Junction Proteinen in Assoziation mit dem selektiven Wechsel der Durchgängigkeit während ihrer Reifung (BRISSETTE et al., 1994). Am Beispiel von Maus-Keratinozyten wurde deutlich, dass in den unterschiedlichen Phasen der Differenzierung auch unterschiedliche Connexine exprimiert werden.

So entstehen bei weniger ausdifferenzierten Zellen vermehrt Cx43 und Cx26. Je ausdifferenzierter die Keratinozyten sind, desto weniger werden diese beiden Connexine gebildet, dafür vermehrt Cx31 und Cx31.1. Durch die unterschiedliche Expression von Cx43 und Cx26 im Wechsel zu Cx31 und Cx31.1 werden diese Kanäle auch für unterschiedliche Substanzen durchgängig. Durch Cx43 und Cx26 Kanäle können zum Beispiel Neurobiotin, Carboxyfluoreszein und Lucifer Yellow hindurch

diffundieren. Im Gegensatz dazu können diese Substanzen durch Cx31 und Cx31.1 nicht mehr diffundieren, sondern nur noch kleinere Moleküle wie Nukleotide und andere Aminosäuren. Genau dieser Umstand der unterschiedlichen Porengröße und somit unterschiedlichen Möglichkeit der Durchlässigkeit bestimmter Substanzen, wurde zum Nachweis verschiedener Connexine eingesetzt. Dieses Phänomen ist durch die unterschiedliche Porengröße der einzelnen Connexine erklärbar (ELFGANG et al., 1995; BRUZZONE et al., 1996b; KOVAL, 2002).

Die Aufgabe der Haut ändert sich im Laufe der embryonalen Entwicklung. Wo bei einem Embryo eine umgebene Hülle vorhanden ist, die ihn zur äußeren umgebenden Flüssigkeit der Amnionhöhle abgrenzt, aber mit ihr im stetigen Kontakt und Stoffaustausch steht, ist bei erwachsenem Lebewesen eine Schutzbarriere gegenüber möglichen schädlichen Umwelteinflüssen entstanden. Die Barrierefunktion der adulten Haut steht im Vordergrund und nicht mehr der stetige Stoffaustausch, wie bei einem sich noch in ständiger Entwicklung befindlichen Embryo. So spielen Connexine gerade in der embryonalen Entwicklung mit einer intensiven Differenzierung der Zellen bzw. des Gewebes eine zentrale Rolle (GREEN, 1988; WARNER, 1988). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum ersten Mal mit der Bedeutung von Connexinen in der Ontogenese des Hühnchens, und zwar am Beispiel des Integuments, d.h., es wird die neben den Säugetieren am höchsten entwickelte Vertebratengruppe in das auf effektiver Kommunikation beruhende Entwicklungsgeschehen einbezogen.

7.2.2. Selektive Connexine bei der Entwicklung des Hühnchens

Während der Ontogenese des Hühnchens wurden in vielen Organen Connexine nachgewiesen mit einer speziellen Gewebeverteilung, wie z.B. Cx42, Cx43 und Cx45 in den Herzmuskelzellen (BEYER et al., 1990; Musil, 1990) und auch Cx45 im Magen (MUSIL, 1990). Für die unterschiedliche Expression während der Entwicklung der Haut, speziell auch der Ausdifferenzierung der Keratinzyten und im Zusammenhang mit der Entwicklung der Federfollikel und der Feder gibt es noch keine Veröffentlichung. Im Gegensatz dazu ist für die Entwicklung der Haut und des Haarfollikels bei der Labormaus ein unterschiedliches Connexinexpressionsmuster bekannt. DI et al. (2001) konnten zeigen, dass hierbei sechs Connexine von entscheidender Bedeutung sind, und zwar Cx26, Cx31, Cx31.1, Cx32, Cx40 und Cx43. So entschlossen wir uns, für unsere Arbeit zur Entwicklung der Hühnerhaut dieses Connexinspektrum zu nutzen.

Das gilt auch für Cx30, welches in der frühen Embryonalentwicklung der Maus vorkommt (HOUGHTON et al., 2002) und für Cx45 das nach BEYER et al. (1990) auffallend häufig im Hühnerembryo vorkommt.

Cx45, Cx43 und Cx42 sind während der Entwicklung des Hühnerembryos in vielen Organen zu finden, wobei sie eine spezielle Gewebeverteilung zeigen. Allen drei Connexinen gemeinsam ist der Nachweis in Herzmuskelzellen während unterschiedlicher Entwicklungsstufen (BEYER et al., 1990). Auch MUSIL et al. (1990) machen deutlich, dass Cx45 im Herzen während der Entwicklung unterschiedlich exprimiert wird. Es ist im gesamten Embryo nachweisbar, mit einer auffälligen Anreicherung im Magenbereich. In der vorliegenden Arbeit war während der embryonalen Entwicklung der Haut und der Federfollikel jedoch kein Nachweis dieses Connexins möglich. Nach BEYER et al. (1990) scheint die mRNA des Cx45 altersbedingt dramatisch abzunehmen. Cx45 ist am 6. Entwicklungstag etwa 10mal mehr im Embryo bei der Entwicklung des Herzens nachweisbar, als bei einem adulten Tier. Cx42 und Cx43 sind im Embryo dagegen nur etwa doppelt soviel wie bei einem erwachsenen Tier vorhanden (BEYER et al., 1990).

Cx43 dagegen kann in der embryonalen Anlage der Linse nachgewiesen werden; dort vor allem in der epithelialen Schicht, nahe der Basalmembran. Auch in der embryonalen Leber ist Cx43 vorhanden (MUSIL et al., 1990). Bei adulten Tieren tritt Cx43 hier nicht mehr auf, dafür aber im Herzen und anderen Geweben (BEYER et al., 1989, BEYER, 1990). In dieser Arbeit ist Cx43 eindeutig in den epidermalen und mesenchymalen Verdichtungen zu Beginn der Federplakodenentwicklung nachweisbar. Auch in den Basalschichtzellen der Epidermis zur Basalmembran hin ist Cx43 in den frühen Stadien gut identifizierbar. Dadurch ist auf eine enge Kommunikation der benachbarten Zellen in den Verdichtungen zu schließen. Da es sich in den epidermalen und dermalen Verdichtungen um das gleiche Connexin handelt, welches auch zwischen den Basalzellen und der Basalmembran liegt, scheint eine Kommunikation zwischen den epidermalen und dermalen Verdichtungen möglich zu sein. Bei der Entwicklung des Federfollikels ist eine intensive Kommunikation zwischen beiden Gewebsanteilen wichtig und über die Connexine möglich.

Cx42 ist im gesamten Embryo zu finden, vor allem in Herz, Leber, Magen und dem M. pectoralis, dagegen nicht in der Linse und in nur geringen Anteilen im Gehirn. Auch wird Cx42 in den frühen embryonalen Stufen in den Blutgefäßen nachgewiesen. Es zeigt ab dem 4. Entwicklungstag ein einheitliches Expressionsmuster wie Cx36 im Myotom.

Dieser Nachweis wurde mittels In-situ-Hybridisierung von BEYER et al. (1990) gesichert. Im Mesoderm des Hühnchenembryos wiesen BERTHOUD et al. (2004) ab dem 2. Entwicklungstag Cx36 auch in den Somiten nach.

Cx43 dagegen war im Dermatome und im Sklerotome zu finden, Cx45 im Myotome und Dermatome (BERTHOUD et al., 2004). Daraus ist zu schließen, dass Cx36, Cx42, Cx43 und Cx45 für die interzelluläre Kommunikation während der Entwicklung der Muskelzelle zuständig sind; auch wenn Cx43 keine Überlappung des Expressionsmusters mit Cx36 und Cx42 aufzeigt. Für sich allein entwickelt Cx43 offenbar eine sehr hohe Expressionsrate im gesamten Embryo. Interessant ist, dass Cx43 in der Entwicklung der Haut nicht nur in den frühen Stadien in den epithelialen Zellen vermehrt exprimiert wird, und zwar bis die Expression in den ausdifferenzierten Keratinozyten des Stratum corneum nicht mehr erkennbar ist, sondern auch im Laufe der Entwicklung in den Fibroblasten der mesenchymalen Verdichtungen der sich bildenden Federfollikel. Dort bevorzugt ebenfalls in den glatten Muskelzellen, die sich erst in den späteren Stadien abgrenzen lassen und den Endothelzellen der Blutgefäße, wobei sich die Cx43 Expression in der ausgereiften Dermis dann auf die Endothelzellen und die glatten Muskelzellen der Federmuskulatur begrenzt. Eine Kommunikation innerhalb der einzelnen Komponenten, wie den Muskelzellen oder auch den Endothelzellen, scheint durch das Cx43 erklärt werden zu können, dass im Laufe der Entwicklung dieser Gewebe auch die umgebenden Gewebe erreicht und so kommunizieren kann. Basis für dieses Geschehen ist die Bildung von Cx43 bereits in den frühen Stadien der Fibroblasten. Eine Kommunikation zwischen der Federplakode und der angrenzenden Epidermis scheint über dieses Connexin gerade in der initialen Phase der Federfollikelbildung möglich und wichtig.

Schon SERRAS et al. (1993) vermuteten eine Kopplung zwischen der Federplakode und der angrenzenden Epidermis, nachdem sie einen eingeschränkten Transport von Lucifer yellow, einem Farbstoff, der durch Connexine hindurchdiffundieren kann, zwischen der Federplakode und der Epidermis zeigen konnten, wobei aber vereinzelte Zellen mit dieser Anfärbung auch in der Epidermis von Hühnerembryonen auftreten und sich somit eine zumindest teilweise Kommunikation der Zellen untereinander vermuten lässt.

Die Einschränkung des Transportes des Farbstoffes in den dermalen Verdichtungen stimmt mit der Abnahme der mitotischen Aktivität überein (WESSELS und ROESSNER, 1965). Während der Entwicklung von Haut und Federn im Hühnerembryo wurde nur

teilweise eine Verbindung der Federanlage und der angrenzenden Hautschichten erkannt (SERRAS et al., 1993). Es besteht also offenbar eine bevorzugte Farbstoffausbreitung von Lucifer Yellow entlang der anterior-posterioren Achse der Federanlage. So ist es möglich, dass bestimmte Hautgebiete über bestimmte Zelladhäsionsmoleküle zu Domänen werden, die über Gap Junctions miteinander kommunizieren bzw. in Verbindung stehen. Dies spricht dafür, dass Gap Junctions während der embryonalen Entwicklung und beim Informationswechsel in embryonalen Zellen eine wesentliche Rolle besitzen und so Funktionseinheiten bilden, die bestimmte Gewebe ausbilden.

Dabei spielt nicht nur die vollständige Kanalbildung der Gap Junctions, die das Zytoplasma der einen Zelle mit demjenigen der benachbarten Zelle verbinden, sondern auch der Stoffaustausch durch Halbkanalbildung mit dem umgebenden Gewebe eine große Rolle. Hierbei liegen Halbkanäle in der Zellmembran einer Zelle, ohne dass das passende Korrelat einer benachbarten Zelle einen vollständigen Kanal bildet, sondern nur mit dem umgebenen Gewebe kommuniziert. Dies ist vor allem am Anfang der Entwicklung wichtig, wenn noch nicht so große Zellverbände vorhanden sind und ein reger Stoffaustausch mit dem umgebenen Milieu besteht. Dieser Austausch kann durch die Halbkanalbildung direkt mit dem Zytoplasma der Zelle geschehen, ohne Diffusion über die Zellmembran (CONTRERAS et al., 2002, 2003; PLOTKIN et al., 2002; VALINUAS 2002; EBIHARA 2003; GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2003; HUR et al., 2003; JIANG und CHERIAN, 2003; LEYBERT et al. 2003).

Diese These wird von anderen Autoren unterstützt, die nachweisen konnten, dass auch Connexine, die nur aus Halbkanälen bestehen und keinen vollständigen Kanal bilden, funktionell tätig sind und ihren Status zwischen offenen und geschlossenen Zustand ständig wechseln. Auch wird bei einigen Zellen erst eine Einlagerung in die Plasmamembran außerhalb der eigentlichen Gap Junctions beobachtet, ehe sie in den Plaques vervollständigt werden und ihre Arbeit aufnehmen (MUSIL und GOODENOUGH, 1991; BRUZZONE et al., 1996b). Möglicherweise ist auch dies ein Grund, warum wir Cx26, Cx32 und Cx43 in den Endothelzellen nachweisen konnten. Das Endothel trennt das Blut mit all seinen Nährstoffen und Blutkörperchen von dem umgebenen Gewebe ab und stellt das Transportmedium durch den gesamten Organismus dar, so wäre eine Kommunikation der Blutbestandteile mit den Endothelzellen über Connexine möglich.

Die Connexine scheinen also nicht nur einzelne Zellen miteinander zu verknüpfen und somit Kommunikationseinheiten zu bilden, sie scheinen darüber hinaus auch Kommunikation zwischen unterschiedlichen Einheiten möglich zu machen, und das nicht nur für bestimmte Bereiche, sondern auch zwischen völlig verschiedenen Geweben, die auch embryonal einen eigenen Ursprung haben. Die Untersuchung der Entwicklung der Haut und im speziellen der Federfollikel mittels der Connexinnachweise bietet somit eine mögliche Erklärung zur Bedeutung der Kommunikation komplexer Gewebe.

Cx26 überwiegt in den frühen Stadien der Epithelentwicklung und nimmt im Laufe der Entwicklung ab. Gerade in den sich stark proliferierenden Zellen, wie z.B. den Zellen des Stratum intermedium lässt sich dies Connexin nachweisen. Nimmt deren Proliferation ab, nimmt auch die Expressionsrate der Connexine ab. Connexin30 ist zudem vor allem in den stark proliferierenden Stratum intermedium-Zellen nachweisbar sowie in den Zellen der Federbasis, die noch eine hohe Proliferationsrate aufweisen und einen niedrigen Differenzierungsgrad. Cx26, Cx30 und Cx32 sind also für die Entwicklung der epidermalen Zellen von großer Bedeutung; im Gegensatz dazu findet man Cx31 bevorzugt in dermalen Zellen.

7.2.3. Selektive Connexine am Beispiel der Entwicklung der Labormaus

Im Vergleich zum Hühnchen besteht die Familie der Gap Junctions bei der Maus aus 13 Typen unterschiedlicher Connexine, die während der Embryonalentwicklung in speziellen Gewebeverbänden exprimiert werden. Dabei wiesen DI et al. (2001) nach, dass während der Entwicklung der Epidermis der Maus nur sechs Connexine eine Rolle spielen: Cx26, Cx31, Cx31.1, Cx32, Cx40 und Cx43. Das Connexin-Vorkommen scheint mit der funktionellen Kopplung bestimmter Gewebe und Zellverbänden in Zusammenhang zu stehen. Es ist auch nachgewiesen, dass die Epidermis aus unterschiedlich vielen kleinen Kommunikationskompartimenten aufgebaut ist (KAM et al., 1986). Dabei gibt es keine spezifischen Grenzen, sondern eine Limitierung durch seitlich auslaufende Kopplungen bildet die Abgrenzung. Ein Kompartiment besteht aus etwa 20-25 Nachbarzellen einschließlich der peripheren Grenzschicht. Antikörper von Cx43 zeigen vor allem in den basalen und suprabasalen epidermalen Schichten eine Reaktion, wobei mit zunehmendem Alter die Expression von Cx43 in der Basalschicht abnimmt. Cx26 wird dagegen vor allem in den äußersten Schichten nachgewiesen.

Cx43 und Cx26 sind in den unteren epidermalen Schichten vorhanden und korrespondieren nicht mit einer vertikalen Ausdehnung von Lucifer Yellow (CHOUDRY et al., 1997).

Des Weiteren konnten diese Autoren zeigen, dass die „gap junctional intercellular communication“ (GJIC) nicht an der dermalen-epidermalen Interaktion teilnimmt. In den frühen Haarfollikelstufen der Maus (Stadium 2) konnte Cx26 nicht gefunden werden, auch Cx43 wird weniger exprimiert als in der darüber liegenden Epidermis.

Die Cx-Expression in der Embryonalentwicklung bei der Maus folgt unterschiedlichen Mustern, d.h. im 2-4 Zellstadium werden v.a. Cx30, Cx31, Cx36, Cx43, Cx45 und Cx57 exprimiert. Im 8-Zellstadium wechselt die Expression zu Cx30.3, Cx31.1 und Cx40 (DAVIS et al., 1996; HOUGHTON et al., 2002). Connexine werden sehr schnell nach der mRNA-Expression hergestellt und befinden sich initial im Zytoplasma. Zu Beginn des Blastomers, im 8-Zellstadium, lagern sich die Connexine aneinander (FLEMING et al., 2001). In Embryonen sind auch die Verbindung der Connexine und der Aufbau der Gap Junctions unabhängige Ereignisse, die nur teilweise miteinander korrelieren (KIDDER et al., 1987).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Cx43 vor allem in den frühen Embryonalstadien, in der die Proliferation überwiegt, gehäuft vorkommt. Im Gegensatz dazu überwiegt die Expression von Cx26 in den späteren Stadien, in denen die Zelldifferenzierung im Vordergrund steht (GOLIGER und PAUL, 1994; RISEK et al., 1994; CHOUDRY et al., 1997). In den späteren Embryonalstadien der Mäuseentwicklung sind vor allem Cx31, Cx31.1, Cx37, Cx40 und Cx45 präsent (BUTTERWECK et al., 1994a; GOLIGER und PAUL, 1994, 1995; CHOUDRY et al., 1997).

Während der Entwicklung der Haut, im speziellen der Epidermis, ist in deren verschiedenen Schichten eine unterschiedliche Expression der einzelnen Connexine nachweisbar. So ist im Mäuseembryo im Stratum basale Cx43, Cx45 und Cx31 eindeutig nachweisbar (RISEK et al., 1994; BUTTERWECK et al., 1994a; RICHARD, 2000). Im Stratum intermedium ist Cx43 nur noch vereinzelt nachweisbar, wobei Cx31 vorhanden und zusätzlich Cx26 nachweisbar ist (RISEK et al., 1994; BUTTERWECK et al., 1994a; RICHARD, 2000). Im Stratum transitivum herrscht dann Cx26 und Cx31 vor (RISEK et al., 1994; BUTTERWECK et al., 1994a). In der gesamten Epidermis lässt sich während der Entwicklung noch Cx30 und Cx37 nachweisen, ohne dass eine auffällige Verteilung in den einzelnen Schichten bekannt ist (RICHARD, 2000).

Auffallend ist nur, dass im Periderm der Mäuseembryonen ein Nachweis von Cx26 und Cx43 möglich ist (RISEK et al., 1994 und RICHARD, 2000).

Spätere Arbeiten zeigten eine Expression von Cx40 und Cx43 in adulter Haut von Mäusen (BUTTERWECK et al., 1994a; RICHARD, 2000). BUTTERWECK et al. (1994a) beschrieben eine Abnahme der Cx31-Expression im Verlauf der Entwicklung vor allem in dem sich bildenden Stratum intermedium und Stratum transitivum. Cx.43 dagegen ließ sich auch im adulten Stratum transitivum nachweisen.

8. Zusammenfassung

Anna Oberthür

Untersuchungen zur speziellen Bedeutung von Connexinen bei der Entwicklung der Hautschichten und der Federfollikel beim Hühnchen

In der frühen Entwicklung des Embryos sind Connexine von großer Bedeutung. Diese intramembranösen Tunnelproteine bilden Halbkanäle, Connexone, zwischen zwei benachbarten Zellen und ermöglichen so einen direkten Informationskontakt. Dies ist gerade während der Ontogenese notwendig, damit die verschiedenen Gewebe und Organe des Tieres geregelt und koordiniert entstehen können. Da in einem Gewebe unterschiedlich ausdifferenzierte Zellen vorhanden sind, ist eine variierende Intensität und Qualität der Connexin-Expression zu erwarten.

Die vorliegende Arbeit weist zum ersten Mal die Bedeutung der Connexin-gesteuerten Entwicklung des Integuments des Huhnes anhand einer immunhistochemischen Untersuchung am Beispiel der Rasse „White Leghorn“ nach, wobei die Kennzeichnung der verschiedenen Entwicklungsstadien auf der Basis der bewährten Normtafel von HAMBURGER und HAMILTON erfolgte.

Hierbei wurde z.B. deutlich, dass Cx26 in der basalen Schicht der sich entwickelnden Epidermis in frühen Stadien auftritt, im Laufe der Entwicklung aber wieder abnimmt. Und zwar in dem Maße, in dem die Ausdifferenzierung der Hautzellen und damit auch die Ausdifferenzierung der Hautschichtung fortschreitet. Dies bedeutet ebenso, dass sich die Aufgaben der Haut im Laufe der Embryogenese verändern, d.h., die Epidermis mit ihrer Basalschicht und dem aufliegenden einschichtigen Periderm, das im regen Kontakt zu der Amnionflüssigkeit steht, wird zu einem mehrschichtigen Epithel des erwachsenen Tieres, welches den Organismus in vielfältiger Weise vor der „Außenwelt“ schützt.

Auch die Entwicklung der sehr komplexen Federstruktur, die im engen Zusammenhang mit der Entwicklung der Hautschichten steht, bedient sich der steuernden Funktion der Connexine. Dies zeigt sich während der Entwicklung des Federfollikels deutlich in der Kommunikation zwischen ektomesodermalen und ektodermalen Zellen, aber auch in der späteren Trennung beider Zellentypen, basierend auf ihrer Connexin-abhängigen Ausdifferenzierung. Z.B. ist während der Zunahme der Mesenchymzellen bei der Entwicklung der Federplakode wiederum Cx26 vermehrt nachweisbar, wie in dieser

Phase auch in den Peridermzellen. Damit ist eine Kommunikation zwischen den ektomesodermalen und ektodermalen Zellen offenkundig. Das bedeutet, dass die Connexin-Expression nicht nur an den Ursprung der embryonalen Zellen gebunden ist, sondern zudem in engem Zusammenhang mit der Gewebeformation steht. Für Connexin30, 31, 32 und 43 konnte ähnliches nachgewiesen werden. Nur Connexin45 zeigte während der Entwicklung der Hühnerhaut und des Federfollikels keine Expression.

9. Summary

Anna Oberthür

A study on the specific significance of connexins during skin layer and feather follicle development in the chicken

Connexins are of great importance during the early development of the embryo. These proteins form intramembranous tunnel half channels, connexons, between two adjacent cells, allowing direct contact information. This is necessary particularly during ontogenesis, so that the various tissues and organs of the animal are formed as a controlled and coordinated result. Regarding that a tissue contains different cells of varying differentiation level, a varying intensity and quality of connexin expression can be expected.

The present study shows for the first time the importance of connexin-driven development for the integument of the chicken, based on immunohistochemistry and "White Leghorns" as representative breed. For the identification of the different stages of development the well-proven normal table of HAMBURGER and HAMILTON was very helpful.

In this way it became obvious that connexin 26 occurs in the basal layer of the developing epidermis during early developmental stages. However, the expression of this connexin decreases in intensity during development according to the degree of skin cell differentiation and the developmental degree of the skin layers. This includes that the tasks of the integument change during the course of embryogenesis, i.e., the epidermis with its basal layer and the overlying monolayered periderm, which is in permanent contact with the amniotic fluid, forms the multi-layered epithelium of the adult animal, thus protecting the organism in many ways against the "outside world".

The development of the very complex feather structure that is closely related to the development of the skin layers, makes also use of the controlling function of connexins. This becomes evident during feather follicle differentiation as based on the communication between ectomesodermal and ectodermal cells, but also by the subsequent separation of the two cell line types related to their connexin-dependent differentiation degree. For example, during the increase in mesenchymal cell numbers

during feather placode development, Cx26 can be increasingly demonstrated, as detectable during this stage also in the peridermal cells. Thus, communication between the ectomesodermal and ectodermal cells is obvious. This means that connexin expression is not only coupled to the origin of embryonic cells, but also closely related to tissue formation. Similar results could be obtained for the connexins 30, 31, 32 and 43. Connexin45 did not show any expression during skin and feather follicle development in the chicken.

10. Literaturverzeichnis

- AHMAD S, EVANS WH (2002)
Post-translational integration and oligomerisation of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions.
Biochem J 365: 693 – 699
- ARCUINO G, LIN JH, TAKANO T, LIU C, JIANG L, GAO Q, KAN J, NEDERGAARD M (2002)
Intercellular calcium signalling mediated by point-source burst release of ATP.
Proc Natl Acad Sci USA 99: 9840 – 9845
- ASSELINEAU D, BERNARD BA, BAILLY C, DARMON M, PRUNIERAS M (1986)
Human epidermis reconstructed by culture: is it “normal”?
J Invest Dermatol 86: 181 - 185
- BARDOT B, LECOIN L, HUILLARD E, CALOTHY G, MARX M (2001)
Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development.
Mech Dev 101: 263 – 265
- BARDOT B, LECOIN L, FLINIAUX I, HUILLARD E, MARX M, VIALLET JP (2004)
Drm/Gremlin, a BMP antagonist, defines the interbud region during feather development.
Int J Dev Biol 48: 149 – 156
- BARRETT AJ (1992)
Cellular proteolysis. An overview.
Ann NY Acad Sci 674 (1): 1 – 15
- BARRIO LC, SUCHYNA T, BARGIELLO T, XU LX, ROGINSKI RS, BENNETT MVL and NICHOLSON BJ (1991)
Gap Junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8410-8484
- BAUMGÄRTNER, C (1993)
Histologische und Histochemische Untersuchungen zur Entwicklung des Federfollikels.
Diplomarbeit, Institut für Zoologie, Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- BECKER DL und DAVIS CS (1995)
Role of gap junctions of the development in the preimplantation mouse embryo
Microscopy Research and Technique 31: 364-374
- BECKER DL, EVANS WH, GREEN CR, WARNER A (1995)
Functional analysis of amino acid sequences in connexin43 involved in intercellular communication through gap junctions.
J Cell Sci 108: 1455 – 1467
- BELLAIRS R, OSMOND M (1989)
Integument .
In: The Atlas of Chick Development, pp 69 – 72 , 284 – 287.
Academic Press, London, New York, Tokio
- BENEDETTI EL, EMMELOT P (1965)
Electron microscopic observations on negatively stained plasma membranes isolated from rat liver.
J Cell Biol 26: 299 – 305
- BENNETT MV, BARRIO LC, BARGIELLO TA, SPRAY DC, HERTZBERG E, SAEZ JC (1991)
Gap junctions: new tools, new answers, new questions.
Neuron 6: 305 – 320

- BERTHOUD VM, COOK AJ, BEYER EC (1994)
Characterization of the gap junction protein connexin56 in the chicken lens by immunofluorescence and immunoblotting.
Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 4109 – 4117
- BERTHOUD VM, SINGH R, MINOQUE PJ, RAGSDALE CW, BEYER EC (2004)
Highly restricted pattern of connexin36 expression in chick somite development.
Anat. Embryol. 209: 11 – 18
- BEYER EC (1990)
Molecular cloning and developmental expression of two chick embryo gap junction proteins.
J Biol Chem 265: 14439 – 14443
- BEYER EC, PAUL DL, GOODENOUGH DA (1987)
Connexin 43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver
J Cell Biol 105: 2621-2629
- BEYER EC, KISTLER J, PAUL DL, GOODENOUGH DA (1989)
Antisera directed against connexin43 peptides react with 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues.
J Cell Biol 108: 595 – 605
- BEYER EC, PAUL DL, GOODENOUGH DA (1990)
Connexin family of gap junction proteins.
J. Membran. Biol. 116: 187 – 194
- BLOOR DJ, WILSON Y, KIBSCHULL M, TRAUB O, LEESE HJ, WINTERHAGER E, KIMBER SJ (2004)
Expression of connexins in human preimplantation embryos in vitro.
Reprod Biol Endocrinol 2: 25
- BONDAREV I, VINE A, BERTRAM JS (2001)
Cloning and functional expression of a novel human connexin 25 gene.
Cell Commun Adhes 8: 167 – 171
- BÖCK P (1989)
Romeis mikroskopische Technik 17. Auflage
Verlag Urban & Schwarzenberg München-Wien
- BOWMAN P, MC LAREN A (1970)
Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro.
J Embryol Exp Morphol 24: 203-207
- BRISSETTE JL, KUMAR NM, GILULA NB, DOTTO GP (1991)
The tumor promotor 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the RAS oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins.
Mol. Cell. Biol. 11, 5364 – 5371
- BRISSETTE JL, KUMAR NM, GILULA NB, HALL JE, DOTTO GP (1994)
Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6453 – 6457
- BRUZZONE R, WHITE TW, SCHERER SS, FISCHBECK KH, PAUL DL (1994)
Null mutations of connexin 32 in patients with X-linked CHARCOT –Marie – Tooth disease.
Neuron 13: 1253 - 1260
- BRUZZONE R, WHITE TW und GOODENOUGH DA (1996 a)
The cellular interne: on-line with connexins.
BioEssays 18: 709-718
- BRUZZONE R, WHITE TW, PAUL DL (1996b)
Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling.
Eur J Biochem 238: 1-27

- BRUZZONE S, GUIDA L, ZOCCHI E, FRANCO L, DE FLORA A (2001a)
Connexin 43 hemi channels mediate Ca^{2+} - regulated transmembrane NAD^{+} fluxes in intact cells.
- BRUZZONE S, FRANCO L, GUIDA L, ZOCCHI E, CONTINI P, BISSO A, USAI C, DE FLORA A (2001b)
A self-restricted CD 38 connexin 43 cross-talk affects NAD^{+} and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts.
J Biol Chem 276: 48300 – 48308
FASEB J 15: 10 – 12
- BROMAN I (1941)
Über die Entstehung und Bedeutung der Embryonaldünen.
Morph. Jahrbuch 86: 141 – 217
- BUTTERWECK A, ELFGANG C, WILLECKE K, TRAUB O (1994a)
Differential expression of the gap junction proteins connexin45,-43,-40,-31 and -26 in mouse skin.
Eur. J. Cell. Biol. 65: 152 – 163
- BUTTERWECK A, GERGS U, ELFGANG C, WILLECKE K, TRAUB O (1994b)
Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin 45 in mouse kidney and transfected *human HeLa cells*.
J Membr Biol 141: 247-256
- CASIO M, KUMAR NM, SAFARIK R, GILULA NB (1995)
Physical characterization of gap junction membrane connexons (hemi-channels) isolated from rat liver.
J. Biol. Chem. 270: 18643 – 18648
- CATTERALL WA (1995)
Structure and function of voltage-gated ion channels.
Annu Rev Biochem 64: 493 – 531
- CAVENEY S (1985)
The role of gap junctions in development.
Annu Rev Physiol 47: 319 – 335
- CHOUDRY R, PITTS JD, HODGINS MB (1997)
Changing patterns of gap junctional intercellular communication and connexion distribution in mouse epidermis and hair follicles during embryogenic development
Dev Dyn 210: 417 – 430
- CHUONG C-M (1990)
Adhesion molecules (N-CAM and tenascin) in embryonic development and tissue regeneration
J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. 10: 147-161
- CHUONG C-M, EDELMAN GM (1985a)
Expression of cell-adhesion molecules in embryonic induction I. Morphogenesis of nestling feathers.
J Cell Biol 101: 1009 – 1026
- CHUONG C-M, EDELMAN GM (1985b)
Expression of cell-adhesion molecules in embryonic induction. II. Morphogenesis of adult feathers.
J Cell Biol 101: 1027 – 1043
- CHUONG C-M, OLIVER G, TING SA, JEGALIAN BG, CHEN H-M, DE ROBERTIS EM (1990)
Gradients of homeoproteins in developing feather buds.
Development 110: 4021 – 4030
- CHUONG C-M, WIDELITZ RB, TING-BERRETH S, JIANG T-X (1996)
Early events during avian skin appendage regeneration: Dependence on Epithelial-Mesenchymal interaction and order of molecular reappearance.
J Invest Dermatol 107: 639 – 646

- CHUONG C-M, WIDELITZ RB (1999)
Feather morphogenesis: a model of the formation of epithelial appendages.
In: Chuong CM (ed) *Molecular Basis of Epithelial Appendage Morphogenesis*. Landes
Bioscience, Georgetown, Texas, USA, pp 57 - 73
- CONTRERAS JE, SANCHEZ HA, EUGENIN EA, SPEIDEL D, THEIS M, WILLECKE K, BUKAUSKAS FF, BENNETT MVL, SAEZ JC (2002)
Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemi channels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture.
Proc Natl Acad Sci USA 99: 495 – 500
- CONTRERAS JE, SAEZ JC, BUKAUSKAS FF and BENNETT MV (2003)
Functioning of Cx43 hemichannels demonstrated by single channel properties
Cell. Comm. Adhes. 10 (4-6): 245-249
- COOPER CD, SOLAN JL, DOLEJSI MK, LAMPE PD (2000)
Analysis of connexin phosphorylation sites.
Methods 20: 196 – 204
- CRUCIANI V, KAALHUS O and MIKALSEN SO (1999)
Phosphatases involved in modulation of gap junctional intercellular communication and dephosphorylation of connexin43 in hamster fibroblasts 2B or not 2B?
Exp Cell Res 252: 449 - 463
- DAHL G, WERNER R, LEVINE E, RABADAN-DIEHL C (1992)
Mutational analysis of gap junctional formation.
Biophys J 62: 172 – 182
- DAHL G, NONNER W, WERNER R (1994)
Attempts to define functional domains of gap junction proteins with synthetic peptides.
Biophys J 67: 1816 – 1822
- DAHL E, WINTERHAGER E, REUSS B, TRAUB O, BUTTERWECK A, WILLECKE K (1996)
Expression of the gap junction proteins connexin 31 and connexin 43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively.
J Cell Sci 109: 191-197
- DANIEL EE, JURY J, WANG YF (2001)
nNOS in canine lower esophageal sphincter: colocalized with Cav-1 and Ca²⁺-handling proteins?
Am J Physiol, Gastrointest Liver Physiol 281: G1101 – G1114
- DARROW BJ, LAING JG, LAMPE PD, SAFFITZ JE, BEYER EC (1995)
Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes.
Circ Res 76: 381 – 387
- DAS SARMA J, WANG F, KOVAL M (2002)
Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization.
J Biol Chem 277: 20911 – 20918
- DAVIES TC, BARR KJ, HOLSTEAD JONES D, ZHU D, KIDDER GM (1996)
Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse.
Dev Genetics 18: 234-243
- DE LAAT SW, TERTOLEN LGF, DORRESTEIJU AWC and VAN DEN BIGGELAAR JAM (1980)
Intercellular communication patterns are involved in cell determination in early molluscan development
Nature 287: 546 - 548

- DHOUAILLY, D (1970)
The determination of specific differentiation of neoptile and teleoptile feathers in the chick and the duck.
J Embryol Exp Morphol 24: 73 – 94 (French)
- DHOUAILLY, D (1973)
Dermo-epidermal interactions between birds and mammals: differentiation of cutaneous appendages.
J Embryol Exp Morphol. 30 (3): 587-603
- DHOUAILLY D (1977)
Dermo-epithelial interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes.
In: Frontier Matrix Biology (ed. L. Robert) 4. Cretail
- DI WL, RUGG EL, LEIGH IM, KELSELL DP (2001)
Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin31.
J Invest Dermatol 117: 958 – 964
- DIEZ JA, ELVIRA M, VILLALOBO A (1998)
The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase phosphorylates connexin32.
Mol Cell Biochem 187: 201 - 210
- DIEZ JA, AHMAD S, EVANS WH (1999)
Assembly of heteromeric connexons in guinea pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions.
Eur J Biochem 262: 142 – 148
- DODSON JW (1967)
The differentiation of epidermis. I. The interrelationship of epidermis and dermis in embryonic chicken skin
J Embryol Exp Morph 17: 83 – 105
- DORTSCHY A (2004)
Immunohistochemische Untersuchungen zum Zytokeratinmuster epithelialer Zellen der Haut des Huhnes
Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover
- DOTTO GP, EL-FOULY M, NELSON C, TROSKO JE (1989)
Similar and synergistic inhibition of gap- junctional communication by ras transformation and tumor promoter treatment of mouse primary keratinocytes.
Oncogene 4: 637 – 641
- DUBAND JL, DUFOUR S, HATTA K, TAKEICHI M, EDELMAN GM, THIERY JP (1987)
Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo.
J Cell Biol 104: 1361 - 1373
- DUNLOP K, TAKEDA K, BREHM P (1987)
Activation of a calcium dependant photoprotein by chemical signaling through gap junctions.
Nature 325: 60 - 62
- DUPONT E, EL AOUMARI A, BRIAND JP, FROMAGET C, GROS D (1989)
Cross –linking of cardiac gap junction connexons by thioldisulfide exchanges.
J Membr Biol. 108: 247 – 252
- EBIHARA L (2003)
Physiology and biophysics of hemi-gap-junctional channels expressed in *Xenopus* oocytes
Acta. Physiol. Scand. 179 (1): 5-8 Review
- EBIHARA L, STEINER E (1993)
Properties of a nonjunctional current expressed from a rat connexin46 cDNA in *Xenopus* oocytes.
J Gen Physiol 102: 59 – 74

- EBIHARA L, XU X, OBERTI C, BEYER EC, BERTHOUD VM (1999)
Co-expression of lens fiber connexins modifies hemi-gap-junctional channel behaviour.
Biophys J 76: 198 - 206
- ELFGANG C, ECKERT R, LICHTENBERG- FRATE H, BUTTERWECK A, TRAUB O, KLEIN RA, HÜLSER DF, WILLECKE K (1995)
Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin – transfected HeLa cells.
J Cell Biol 129: 805 – 817
- ESKANDARI S, ZAMPIGHI GA, LEUNG DE, WRIGHT EM, LOO DD (2002)
Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers.
J Membr Biol 185: 93 - 102
- EVANS WH, CARLILE G, RAHMAN S, TOROK K (1992)
Gap junction communication channel: peptides and anti-peptide antibodies as structural probes.
Biochem Soc Trans 20: 856 – 861
- FALK MM, KUMAR NM, GILULA NB (1994)
Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins.
J Cell Biol 127: 343 – 355
- FELL HB, MELLANBY E (1953)
Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A.
J Physiol 119: 470 – 488
- FLAGG-NEWTON JL, DAHL G, LOEWENSTEIN WR (1981)
Cell junction and cyclic AMP: 1. Upregulation of junctional membrane permeability and junctional membrane particles by administration of cyclid nucleotide or phosphodiesterase inhibitor.
J Membr Biol 63: 105 - 121
- FLAXMAN BA (1972)
Cell differentiation and its control in the vertebrate epidermis.
Am Zool 12: 13 – 25
- FLEMING TP, SHETH B und FESENKO I (2001)
Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis
Frontiers in Bioscience 6: D 1000 – D1007
- FRANKE WW, COWIN P, SCHMELZ M, KAPPRELL HP (1987)
The desmosomal plaque and the cytoskeleton.
CIBA Found Symp 125: 26 – 48
- FUCHS E, GREEN H (1981)
Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A.
Cell 25: 617 - 625
- FUCHS E (1990)
Epidermal differentiation: The bare essentials.
J Cell Biol 111: 2807 - 2814
- FUJIMOTO K, NAGAFUCHI A, TSUKITA S, KURAOKA A, OHOKUMA A, SHIBATA Y (1997)
Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation.
J Cell Sci 110: 311 – 322
- GEORGE CH, KENDALL JM, EVANS WH (1999)
Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions.
J Biol Chem 274: 8678 – 8685

- GERBER A (1939)
Die embryonale und postembryonale Pterylose der Alectora morphae.
Rev Suisse Zool 46: 162 – 321
- GIEPMANS BN, MOOLENAAR WH (1998)
The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein.
Curr Biol 8: 931 - 934
- GIEPMANS BN, VERLAAN I, HENGVELD T, JANSSEN H, CALAFAT J, FALK MM, MOOLENAR WH (2001)
Gap junction protein connexin43 interacts directly with microtubules.
Curr Biol 11: 1364 – 1368
- GOLIGER JA, PAUL DL (1994)
Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37 and Cx43 in developing and mature rat epidermis.
Dev Dyn 200: 1 – 13
- GOLIGER JA, PAUL DL (1995)
Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication.
Mol Biol Cell 6: 1491 – 1501
- GOLLIEZ R (1966)
Beitrag zur Pterylose von *Melopsittacus undulatus* Shaw mit besonderer Berücksichtigung der Filoplume.
Verh Naturforsch Ges Basel 77: 315 – 364
- GOMEZ-HERNANDEZ JM, MIGUEL M, LARROSA B, GONZALEZ D, BARRIO LC (2003)
Molecular basis of calcium regulation in connexin32 hemichannels.
Proc Natl Acad Sci USA 100: 16030 - 16035
- GOODENOUGH DA (1992)
The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication.
Semin Cell Biol 3: 49 – 58
- GOODENOUGH DA, PAUL DL, JESAITIS L (1988)
Topological distribution of two connexin32 antigenic sites in intact and split rodent hepatocyte gap junctions.
J Cell Biol 107: 1817 – 1824
- GOSHROY S, GOODENOUGH DA, SOSINSKY GE (1995)
Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA.
J Membr Biol 146: 15 – 28
- GOURDIE RG, GREEN CR, SEVERS NJ, ANDERSON RH, THOMPSON RP (1993)
Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart.
Circ Res 72: 278 – 289
- GUTHRIE SC, GILULA NB (1989)
Gap junctional communication and developing.
Trends Neurosci 12: 12 – 16
- GREEN CR, HARFST E, GOURDIE RG, SEVERS NJ (1988)
Analysis of the rat liver gap junction protein: clarification of anomalies in its molecular size.
Proc Trans Roy Soc (Lond.) B 233: 165 - 174
- GROS DB, NICHOLSON BJ, REVEL JP (1983)
Comparative analysis of the gap junction protein from rat heart and liver: is there a tissue specificity of gap junctions?
Cell 35: 539 – 549

- GRÜMMER R, REUSS B, WINTERHAGER F (1996)
Expression pattern of different gap junction connexins is related to embryo implantation.
Int J Dev Biol 40: 361 – 367
- GUERRIER A, FONLUPT P, MORAND I, RABILLOUD R, AUDEBET C, KRUTOCSKIKH V, GROS D, ROUSSET B, MUNARI – SILEM Y (1995)
Gap junctions and cell polarity: connexin32 and connexin43 expressed in polarized thyroid epithelial cells assemble into separate gap junctions, which are located in distinct regions of the lateral plasma membrane domain.
J Cell Sci 108: 2609 – 2617
- GUPTA VK, BERTHOUD VM, ATAL N, JARILLO JA, BARRIO LC, BEYER EC (1994)
Bovine connexin44, a lens gap junction protein: molecular cloning, immunologic characterization, and functional expression.
Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 3747 – 3758
- HAAKE AR, KÖNIG G and SAWYER (1984)
Avian feather development: relationships between morphogenesis and keratinization.
Dev. Biol. 106 (2): 406-413
- HAEFLIGER JA, BRUZZONE R, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND NJ, PAUL DL (1992)
Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression and chromosome mapping.
J Biol Chem 267: 2057 – 2064
- HAMBURGER V, HAMILTON HL (1951)
A series of normal stages in the development of the chick embryo.
J Morph 88: 49 – 98
- HAMILTON HL (1952)
Lillies's Development of the Chick.
Henry Holt & Co, New York
- HANSTEDE JG und GERRITS PO (1983)
The effect of embedding in watersoluble plastics on the final dimensions of liver sections
J. Micros. 131: 79 - 86
- HARDY MH (1968)
Glandular metaplasia of hair follicles and other responses to vitamin A excess in cultures of rodent skin.
J Embryol Exp Morphol 19: 157 – 180
- HARDY K, WARNER A, WINSTON RM, BECKER DL (1996)
Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo.
Mol Human Reprod 2: 621 – 632
- HARRIS MP, FALLON JF, PRUM RO (2002)
Shh-Bmp2 signalling module and the evolutionary origin and diversification of feathers.
J Exp Zool 294: 160 – 176
- HENNEMANN H, DAHL E, WHITE JB, SCHWARZ HJ, LALLEY PA, CHANG S, NICHOLSON BJ, WILLECKE K (1992)
Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked in chromosomes 4 and preferentially expressed in skin.
J Biol Chem 267: 17225 – 17233
- HERTZBERG EL, SKIBBENS RV (1984)
A protein homologous to the 27.000 dalton liver gap junction protein is present in a wide variety of species and tissues.
Cell 39: 61 – 6949

- HERTZBERG EL, SPRAY DC and BENNETT MV (1985)
Reduction of gap junctional conductance by microinjection of antibodies against the 27-kDa liver gap junction polypeptide
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (8): 2412 - 2416
- HERTZBERG EL, VAN ELDIK LJ (1987)
Interaction of Calmodulin and other calcium-modulated proteins with gap junctions.
Methods Enzymol 139: 445 - 454
- HERTZBERG EL, DISHER RM, TILLER AA, ZHOU Y, COOK RG (1988)
Topology of the Mr 27000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino- and carboxyl termini and a hydrophilic domain which is protease-hypersensitive.
J. Biol. Chem. 263: 19105 – 19111
- HEYNKES R, KOZJEK G, TRAUB O, WILLECKE K (1986)
Identification of a rat liver cDNA and mRNA coding for the 28 kDa gap junction protein.
FEBS Lett 205: 56 – 60
- HILLE B (1992)
Ionic channels of excitable membranes
Sinauer Associates, Sunderland MA 607 pp
- HOH JH, JOHN SA, REVEL JP (1991)
Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin31.
J Biol Chem 266: 6524 – 6531
- HOH JH, SOSINSKY GE, REVEL JP, HANSMA PK (1993)
Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy.
Biophys J 65: 149 - 163
- HOLM I, MIKHAILOV A, JILLSON T, ROSE B (1999)
Dynamics of gap junctions observed in living cells with connexin43-GFP chimeric protein.
Eur J Cell Biol 78: 856 – 866
- HONJO H, BOYETT MR, COPPEN SR, TAKAGISI Y, OPTHOF T, SEVERS NJ, KODAMA I (2002)
Heterogeneous expression of connexins in rabbit sinoatrial node cells: correlation between connexin isotype and cell size.
Cardiovasc Res 53: 89 - 96
- HORNICKEL I, KACZA J, SCHNAPPER A, BEYERBACH M, SCHOENNAGEL B, SEEGER J, MEYER W (2011)
Demonstration of substances of innate immunity in the esophagus epithelium of domesticated mammals. Part I – Methods and comparative fixation evaluation.
Acta Histochem J 113 (in press) &DOI:10.1016/j.acthis.2009.09.009?
- HOTZ-WAGENBLATT A, SHALLOWAY D (1993)
Gap junctional communication and neoblastic transformation.
Crit. Rev. Oncogen 4: 541 - 548
- HOUGHTON FD, BARR KJ, WALTER G, GABRIEL H-D, GRÜMMER R, TRAUB O, LEESE HJ, KIDDER GM (2002)
Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development.
Biol Reprod 66: 1403 - 1412
- HOUGHTON FD (2005)
Role of gap junctions during early embryo development.
Reproduction 129: 129 – 135
- HUMPREY PS, PARKES KC (1959)
An approach to the study of molts and plumages.
Auk 76: 1 – 31

- HUR KC, SHIM JE, JOHNSON RG (2003)
A potential role for connexin43-hemichannels in staurosporin induced apoptosis.
Cell Commun Adhes 10: 271 - 277
- JAN LY, JAN YN (1990)
How might the diversity of potassium channels be generated?
Trends Neurosci 13: 415 – 419
- JAN LY, JAN YN (1994)
Potassium channels and their evolving gates.
Nature 371: 119 – 122
- JENKINSON DM and BLACKBURN PS (1968)
The distribution of nerves, monoamine oxidase and cholesterinesterase in the skin of poultry
Res. Vet. Sci. 9 (5): 429 - 434
- JIANG TX, CHUONG CM (1992)
Mechanism of skin morphogenesis. I. Analyses with antibodies to adhesion molecules tenascin, N-CAM and integrin.
Dev Biol 150: 82 – 98
- JIANG TX, PAUL DL, GOODENOUGH DA (1993)
Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin46: a slow occurens.
Invest Ophthal Visual Sci 34: 3558 - 3565
- JIANG TX, JUNG HS, WIDELITZ RB, CHUONG CM (1999)
Self-organization of periodic patterns by dissociated feather mesenchymal cells and the regulation of size, number and spacing of primordia.
Development 126: 4997 – 5009
- JIANG TX, CHERIAN PP (2003)
Hemichannels formed by connexin43 play an important role in the release for prostaglandin E2 by osteocytes in response to the mechanical strain.
Cell Commun Adhes 10: 259 - 264
- JIANG TX, WIDELITZ RB, SHEN W-M, WILL P, WU D-Y, LIN C-M, JUNG H-S, CHUONG CM (2004)
Integument pattern formation involves genetic and epigenetic controls: feather arrays simulated by digital hormones.
Int. J. Dev. Biol. 48: 117 – 135
- JOHN SA, REVEL JP (1991)
Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin43.
Biochem Biophys Res Commun 178: 1312 – 1318
- JOHN SA, KONDO R, WANG SY, GOLDHABER JI, WEISS JN (1999)
Connexin43 hemichannels opened by metabolic inhibition.
J Biol Chem 274: 236 - 240
- JORDAN K, CHODOCK R, HAND AR, LAIRD DW (2001)
The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization.
J Cell Sci 114: 763 – 773
- JUNQUEIRA RA, CARNEIRA J (1996)
Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 4. Auflage,
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- KALLMAN, F; EVANS, J, WESSELS, NK (1967)
Anchor filament bundles in embryonic feather germs and skin.
J Cell Biol 32: 236 – 240
- KAM E, MELVILLE L, PITTS JD (1986)
Patterns of junctional communication in skin.
J Invest Dermatol 87: 748 – 753

- KARDAMI E, STOSKI RM, DOBLE BW, YAMAMOTO T, HERTZBERG EL, NAGY JI (1991)
Biochemical and structural evidence for the association of basic fibroblast growth factor with cardiac gap junctions.
J Biol Chem 266: 19551 - 19557
- KEIBEL F und ABRAHAM L (1900)
Normtafel zur Entwicklungsgeschichte des Huhnes (*Gallus domesticus*)
Gustav Fischer Verlag, Jena
- KIDDER GM, RAINS J, MCKEON J (1987)
Gap junction assembly in the preimplantation mouse conceptus is independent of microtubules, microfilaments, cell flattening and cytokinesis.
PNAS 84: 3718 - 3722
- KIDDER GM (1992)
The genetic program for preimplantation development.
Dev Genet 13: 319 – 325
- KISTLER J, BOND J, DONALDSON P, ENGEL A (1993)
Two distinct levels of gap junctions assembly in vitro.
J Struct Biol 110: 28 - 38
- KOECKE HU (1968)
Vergleichende Histologie der Haut
In: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Ergw. I/1
Hrsg.: J. Jadassohn). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 920 – 1033,
- KOECKE HU and KÜHN O (1962)
Die embryonale Pterylose und ihre entwicklungsphysiologischen Vorbedingungen bei der Hausente (*Anas boschas domestica*) I
Z. Morph. Ökol. Tiere 50: 651 - 686
- KOJIMA T, MITAKA T, PAUL DL, MORI M, MOCHIZUKI Y (1995)
Reappearance and long-term maintenance of connexin32 in proliferated adult rat hepatocytes: use of serum-free L-15 medium supplemented with EGF and DMSO.
J. Cell Sci. 108: 1347 – 1357
- KOJIMA T, SAWADA N, CHIBA H, KOKAI Y, YAMAMOTO M, URBAN M, LEE GH, HERTZBERG EL, MOCHIZUKI Y, SPRAY DC (1999)
Induction of tight junctions in human connexin32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin32 interacts with occluding.
Biochem Biophys Res Commun 266: 222 – 229
- KOJIMA T, KOKAI Y, CHIBA H, YAMAMOTO M, MOCHIZUKI Y, SAWADA N (2001)
Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes.
Exp Cell Res 263: 193 – 201
- KOJIMA T, SPRAY DC, KOKAI Y, CHIBA H, MOCHIZUKI Y and SAWADA N (2002)
Cx32 formation and/or Cx32 mediated intercellular communication induces expression and function of tight junctions in hepatocytic cell line
Exp. Cell. Res. 276: 40 - 51
- KONDO RP, WANG SY, JOHN SA, WEISS JN, GOLDBERGER JI (2000)
Metabolic inhibition activates a non-selective current through connexin hemichannels in isolated ventricular myocytes.
J Mol Cell Cardiol 32: 1859
- KOVAL M, GEIST ST, WESTPHALE EM, KENNEDY AE, CIVITELLI R, BEYER EC, STEINBERG TH (1995)
Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43.
J Cell Biol 130: 987 - 995

- KUMAR NM, GILULA NB (1986)
Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein.
J Cell Biol 103: 767 – 776
- KUMAR NM, GILULA NB (1992)
Molecular biology and genetics of gap junction channels
Semin Cell Biol 3: 3- 16
- KUMAR NM, GILULA NB (1996)
The gap junction communication channel.
Cell 84: 381 - 388
- KWAK BR, SAEZ JC, WILDERS RW, CHANSON M, FISHMAN GL, HERTZBERG EL, SPRAY DC, JONGSMA HJ (1995)
Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels.
Pflügers Arch 430: 770 - 778
- LAING JG, WESTPHALE EM, ENGELMANN GL, BEYER EC (1994)
Characterization of the gap junction protein, connexin45.
J Membr Biol 139: 31 – 40
- LAING JG, MANLEY-MARKOWSKI RN, KOVAL M, CIVITELLI R, STEINBERG TH (2001)
Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells.
J Biol Chem 276: 23051 - 23055
- LAIRD DW, PURANAM KL, REVEL JP (1991)
Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes.
Biochem J 273: 67 - 72
- LAIRD DW, CASTILLO M, KASPRZAK I (1995)
Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefelding A-treated rat mammary tumor cells.
J Cell Biol 131: 1193 – 1203
- LAL R, JOHN SA, LAIRD DW, ARNSDORF MF (1995)
Heart gap junction preparations reveal hemiplaques by atomic force microscopy.
Am J Physiol 268 (Pt1): C968 - 977
- LAMPE PD, LAU AF (2000)
Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins.
Arch Biochem Biophys 384: 205 – 215
- LARSEN WJ, TUNG HN (1978)
Origin and fate of cytoplasmic gap junctional vesicles in rabbit granulosa cells.
Tissue Cell 10: 585 – 598
- LARSEN WJ (1983)
Biological implications of gap junction structure, distribution and composition: a review.
Tissue Cell 15: 645 – 671
- LARSEN WJ, WERT SE (1988)
Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development.
Tissue & Cell 20: 809 – 848
- LAUF U, GIEPMANS BN, LOPEZ P, BRACONNOT S, CHEN SC, FALK MM (2002)
Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and aggregation to gap junctions in living cells.
Proc Natl Acad Sci USA 99: 10446 – 10451
- LAWRENCE TS, BEERS WH, GILULA NB (1978)
Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication.
Nature 272: 501 – 506

- LAZRAK A, PERRACHIA C (1993)
Gap junction gating sensitivity to physiological internal calcium regardless of pH in Novikoff hepatoma cells.
Biophys J 65: 1422 - 1433
- LEUBE RE (1995)
The topogenic fate of the polytopic transmembrane proteins, synaptophysin and connexin, is determined by their membrane-spanning domains.
J. Cell Sci 108: 883 – 894
- LEYBERT L, BRALT K, VANDAMME W, CABOOTER L, MARTIN WE, EVANS WH (2003)
Connexin channels, connexin mimetic peptides and ATP release.
Cell Commun Adhes 10: 251 - 257
- LI H, LIU TF, LAZRAK A, PERACCHIA C, GOLDBERG GS, LAMPE PD, JOHNSON RG (1996)
Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells.
J Cell Biol 134: 1019 – 1030
- LIU TF, PAULSON AF, LI HY, ATKINSON MM and JOHNSON RG (1997)
Inhibitory effects of 12-O-tetradecanophorbol-13-acetate on dye leakage from single Novikoff cells and on dye transfer between reaggregated cell pairs.
Methods Find Exp Clin Pharmacol 19: 573 – 577
- LO CW, GILULA NB (1979)
Gap junctional communication in the post -implantation mouse embryo.
Cell 18: 411 – 422
- LOEWENSTEIN WR, ROSE B (1992)
The cell-cell channel in the control of growth.
Semin Cell Biol 3: 59 - 79
- LU C, ZHANG H, DENG H, XIA K, PAN Q, XIA J (2002)
Molecular cloning of the human Cx58 gene.
Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 19: 95 – 99
- LUCAS AM, STETTENHEIM PR (1972)
Avian Anatomy. Integument. Part I and Part II (Agriculture Handbook 362),
Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.
- LUCAS AM (1980)
Lipoid secretion by the body epidermis in avian skin. In: The skin of Vertebrates (eds SPEARMAN RIC, RILEY PA), Academic Press, London, New York, pp 33 – 47.
- MACKINNON R (1995)
Pore loops: an emerging theme in ion channel structure.
Neuron 14: 889 – 892
- MADERSON PF, ALIBARDI L (2000)
The development of the sauropsid integument: a contribution to the problem of the origin and evolution of feathers.
Amer Zool 40: 513 - 529
- MAKOWSKI L, CASPAR DLD, PHILLIPS WC, GOODENOUGH DA (1977)
Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data.
J Cell Biol 74: 629 – 645
- MAKOWSKI L (1988)
X-Ray diffraction studies of gap junction structure
Adv. Cell. Biol. 2: 119 - 158

- MANTHEY D, BANACH K, DESPLANTEZ T, LEE CG, KOZAK CA, TRAUB O, WEINGART R, WILLECKE K (2001)
Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical Properties of gap junction channels.
J Membr Biol 181: 137 – 148
- MARTIN PE, BLUNDELL G, AHMAD S, ERRINGTON RJ, EVANS WH (2001)
Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels.
J Cell Sci 114: 3845 – 3855
- MATOLTSY AG (1969)
Keratinization of the avian epidermis. An ultrastructural study of the newborn chick skin.
J Ultrastruct Res 29: 438 - 458
- MATULIONIS DH (1970)
Morphology of the developing down feathers of chick embryos. A descriptive study at the ultrastructural level of differentiation and keratinisation.
Z Anat Entw Gesch 132: 107 – 157
- MAYERSON PL, FALLON JF (1985)
The spatial pattern and temporal sequence in which feather germs arise in the White Leghorn chick embryo.
Dev Biol 109: 259 - 267
- MAZET F, WITTENBERG BA, SPRAY DC (1985)
Fate of intercellular junctions in isolated adult rat cardiac cells.
Circ Res 56: 195 - 204
- MEDA P, MICHAELS RL, HALBAN PA, ORCI L, SHERIDAN JD (1983)
In vivo modulation of gap junctions in dye coupling between B-cells of the intact pancreatic islet.
Diabetes 32: 858 – 868
- MEDA P, PEPPER MS, TRAUB O, WILLECKE K, GROS D, BEYER E, NICHOLSON B, PAUL D, ORCI L (1993)
Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands.
Endocrinology 133: 2371 – 2378
- MEGE RM, MATSUZAKI F, GALLIN WJ, GOLDBERG JI, CUNNINGHAM BA, EDELMAN GM (1988)
Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules.
Proc Natl Accad Sci USA 85: 7274 - 7278
- MERINO R, RODRIGUEZ-LEON J, MACIAS D, GANAN Y, ECONOMIDES AN, HURLE JM (1999)
The BMP antagonist GREMLIN regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb.
Development 126: 5515 – 5522
- MENON GK, AGGARWAL SK, LUCAS AM (1981)
Evidence of the holocrine nature lipoid secretion by avian epidermal cells: a histological and fine structural study of rictus, toe web and the uropygial gland.
J Morph 167: 185 – 199
- MENON GK, BROWN BE, ELIAS PM (1986)
Avian epidermal differentiation : role of lipids in permeability barrier formation.
Tissue & Cell 18: 71 – 82
- MEYER W, FATH EL-BAB M R und SCHWARZ R (1984)
Immunohistochemical demonstration of target cells for sexual hormones in the skin of the pig
Cell Mol Biol 30: 269 - 274

- MEYER W, BARTELS T, NEURAND K (1989)
Anmerkungen zur Faserarchitektur der Vertebraten-Dermis.
Z Zool Syst Evolut-Forsch 27: 115 - 125
- MEYER W, BAUMGÄRTNER G (1998)
feather growth in the chicken.
J Anat (Lond) 193, 611 - 616
- MILKS LC, KUMAR NM, HOUGHTEN R, UNWIN N, GILULA NB (1988)
Topology of the 32 kDa liver gap junction protein determined by site directed antibody localizations.
EMBO J 7: 2967 - 2975
- MURRAY SA, LARSEN WJ, TROUT J, DONTA ST (1981)
Gap junction assembly and endocytosis correlated with patterns of growth in a cultured adrenocortical tumor cell (SW-13).
Cancer Res 41: 4063 – 4074
- MURRAY SA, FLETCHER WH (1984)
Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent Protein kinase.
J Cell Biol 98: 1710 - 1719
- MUSIL LS (1994)
Structure and assembly of gap junctions.
In: Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: From development to disease (ed CITI S), R.G. Landes Co. Austin TX, pp 173 – 194
- MUSIL LS, BEYER EC, GOODENOUGH DA (1990)
Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization and post-translational phosphorylation.
J Membr Biol 116: 163 - 175
- MUSIL LS, GOODENOUGH DA (1991)
Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation and assembly into gap junctional plaques.
J Cell Biol 115: 1357 – 1374
- MUSIL LS, GOODENOUGH DA (1993)
Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER.
Cell 74: 1065 – 1077
- NAUS CC, HEARN S, ZHU D, NICHOLSON BJ, SHIVERS RR (1993)
Ultrastructural analysis of gap junctions in C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA.
Exp Cell Res 206: 72 – 84
- NAGY JI, LI X, REMPEL J, STELMACK G, PATEL D, STAINES WA, YASUMURA T, RASH JE (2001)
Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43.
J Comp Neurol 441: 302 – 323
- NICHOLSON BJ, GROS DB, KENT SB, HOOD LE, REVEL JP (1985)
The Mr 28000 gap junction proteins from rat heart and liver are different but related.
J Biol Chem 260: 6514 – 6517
- NICHOLSON BJ, DERMETZEL R, TELOW D, TRAUB O, WILLECKE K, REVEL JPP (1987)
Two homologous protein components of hepatic gap junction.
Nature 329, 732 – 734
- NIELSEN PA, BARUCH A, GIEPMANS BN, KUMAR NM (2001)
Characterization of the association of connexins and ZO-1 in the lens.
Cell Commun Adhes 8: 213 - 217

- NIELSEN PA, BEAHM DL, GIEPMANS BN, BARUCH A, HALL JE, KUMAR NM (2002)
Molecular cloning, functional expression and tissue distribution of a novel human gap junction forming protein, connexin31.9.
Interaction with zona occludens protein – 1.
J Biol Chem 277: 38272 – 38283
- NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E (1992)
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd 5,
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- NORAMLY S, MORGAN BA (1998)
BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development.
Development 125: 3775 – 3787
- NORAMLY S, FREEMAN A, MORGAN BA (1999)
 β -catenin signaling can initiate feather bud development.
Development 126: 3509 - 3521
- OHYAMA A, SAITO F, OHUCHI H, NOJI S (2001)
Differential expression of two BMP antagonists, GREMLIN and Follastatin, during development of the chick feather bud.
Mech Dev 100: 331 – 333
- OKUMA A, KURAOKA A, IIDA H, INAI T, WASANO K, SHIBATA Y (1996)
Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary.
J Reprod Fertil 107: 255 – 264
- OSTMANN OW, RINGER RK, TETZLAFF M (1963)
The anatomy of feather follicle and immediate surroundings.
Poultry Sci 42: 958 - 969
- PAGE E, SHIBATA Y (1981)
Permeable junctions between cardiac cells.
Annu Rev Physiol 43, 431 – 441
- PAUL DL (1986)
Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction.
J Cell Biol 103, 123 – 134
- PASS DA (1989)
The pathology of the avian integument: a review.
Avian Pathol 18: 1 – 72
- PATEL K, MAKARENKOVA H und JUNG HS (1999)
The role of long range, local and direct signalling molecules during chick feather bud development involving the BMP's, follastatin and the Eph receptor tyrosine kinase Eph-A4
Mechanisms of Development 86: 51 - 62
- PAUL DL, EBIHARA I, TAKEMOTO LJ, SWENSON KI, GOODENOUGH DA (1991)
Connexin 46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes.
J Cell Biol 115, 1077 – 1089
- PAYS L, CHARVET I, HEMMING FJ, SAXOD R (1997)
Close link between cutaneous nerve pattern development and feather morphogenesis demonstrated by experimental production of neo-apteria and ectopic feathers: implication of chondroitin sulphate proteoglycans and other matrix molecules.
Anat Embryol (Berl) 195: 457 - 466
- PELLETIER RM (1988)
Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*).
Am J Anat 183: 68 – 102

- PERRACCHIA C, WANG X, PERACCHIA LL (1996)
Inhibition of calmodulin expression prevents low-pH-induced gap junction uncoupling in *Xenopus* oocytes.
Pflügers Arch 431 (3): 379 - 387
- PIETROBAN D, DI VIRGILIO F, POZZAN T (1990)
Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells.
Eur J Biochem 193 (3): 599 - 622
- PLOTKIN LI, MONOLAGAS SC, BELLIDO T (2002)
Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels.
J Biol Chem 277: 8648 – 8657
- PRIN F, DHOUAILLY D (2004)
How and when the regional competence of chick epidermis is established: feathers vs scutate and reticulate scales, a problem en route to a solution.
Int J Dev Biol 48: 137 - 148
- PRUM RO (1999)
Development and evolutionary origin of feathers.
J Exp Zool 285: 291 - 306
- QIUST AP, RHEE SK, LIN H, LAL R (2000)
Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation.
J Cell Biol 148: 1063 – 1074
- RAHMAN S, EVANS WH (1991)
Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulfide linkage connecting the two extracellular peptide loops.
J Cell Sci 100, 567 – 578
- RAHMAN S, CARLILE G, EVANS WH (1993)
Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies.
J Biol Chem 268: 1260 – 1265
- RASH JE, YASUMURA T (1999)
Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin-4 in freeze-fracture replicas of liver, brain and spinal cord: factors limiting quantitative analysis.
Cell Tiss Res 296: 307 – 321
- REVEL JP (1988)
The oldest multicellular animal and its junctions In: Gap Junction (Eds. E.L. Hertzberg and R.S. Johnson)
Modern. Cell. Biol. (Alan R. liss. Inc. New York) 7: 135 - 149
- REVEL JP, KARNOVSKY MJ (1967)
Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver.
J Cell Biol 33: C7 – C12
- RICHARD G (2000)
Connexins: a connection with the skin.
Exp Dermatol 9: 77 - 96
- RISEK B, GUTHRIE S, KUMAR N, GILULA NB (1990)
Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat.
J Cell Biol 110, 269 – 282
- RISEK B, KLIER FG, GILULA NB (1992)
Multiple gap junction genes are utilized during rat skin and hair development.
Development 116, 639 – 651
- RISEK B, KLIER FG, GILULA NB (1994)
Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions.
Dev Biol 164, 183 – 196

- RISLEY MS, TAN IP, ROY C, SAEZ JC (1992)
Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junction in testes.
J Cell Sci 103: 81 – 96
- ROBERTSON JD (1963)
The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of the club endings in Mauthner cell synapses in goldfish brains.
J Cell Biol 19: 201 – 221
- ROMANELLO M, D'ANDREA P (2001)
Dual mechanism of intercellular communication in HOBIT osteoblastic cells: A role for gap-junctional hemichannels.
J Bone Miner Res 16: 1465 – 1476
- ROSE B, LOEWENSTEIN WR (1976)
Permeability of a cell junction and the local cytoplasmatic free ionized calcium concentration. A study with aquorin.
J Membr Biol 28: 87 - 119
- SAEZ JC, SPRAY DC, NAIRN AC, HERTZBERG E, GREENGARD P, BENNETT MV (1986)
cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide.
Proc Natl Acad Sci USA 83: 2473 - 2477
- SAEZ JC, CONNOR JA, SPRAY DC, BENNETT MVL (1989a)
Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger inositol1,4,5-triphosphate and calcium ions.
Proc Natl Acad Sci USA 86: 2708 – 2712
- SAEZ JC, GREGORY WA, WATANABE T, DERMIETZEL R, HERTZBERG EL, REID L, BENNETT MVL, SPRAY DC (1989)
cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary culture.
Am J Physiol Cell Physiol 257: C1 – C11
- SAEZ JC, NAIRN AC, CZERNIC AJ, SPRAY DC, HERTZBERG EL, GREENGARD P, BENNETT MV (1990)
Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II.
Eur J Biochem 192: 263 – 273
- SAEZ JC, NAIRN AC, CZERNIC AJ, FISHMAN GI, SPRAY DC, HERTZBERG EL (1997)
Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions.
J Mol Cell Cardiol 29: 2131 – 2145
- SAEZ JC, MARTINEZ AD, BRANES MC, GONZALES HE (1998)
Regulation of gap junctions by protein phosphorylation.
Braz J Med Biol Res 31: 593 – 600
- SAEZ JC, SEPULVEDA MA, ARAYA R, SAEZ CG, PALISSON F (1998)
Concanavalin A-activated lymphocytes form gap junctions that increase their rate of DNA replication.
In: Gap Junctions (ed WERNER R), IOS, Amsterdam, p. 372 – 381
- SAFFITZ JE, LAING JG, YAMADA KA (2000)
Connexin expression and turnover: implications for cardiac excitability.
Circ Res 86: 723 – 728

- SAINIO K, GILBERT SF, LEKTONEN E, NISKI M, KUMAR NM, GILULA NB and SAXEN L (1992)
Differential expression of gap junction mRNAs and proteins in the developing murine kidney and in experimentally induced nephric mesenchyms
Development 115 (3): 827 - 837
- SALOMON D, MASGRAU E, VISCHER S et al. (1994)
Topography of mammalian connexins in human skin.
J Invest Dermatol 103: 240 – 247
- SALOMON D, MASGRAU E, VISCHER S, CHANSON M, SAURAT J-H, SPRAY D, MEDA P (1993)
Gap junction proteins and communication in human epidermis I. Gap Junctions.
Prog Cell Res 3: 225 – 231
- SAMBROOK J und RUSSEL DW (2001)
Molecular Cloning, A laboratory manuel 3rd Edition
Pp 73 ff
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- SANDBERG K, JI H, CLARK AJ, SHAPIRA H, CATT KJ (1992)
Intercellular communication between follicular angiotensin receptors and *Xenopus laevis* oocytes: medication by an inisotol-1,4,5-triphosphate dependant mechanism.
J Cell Biol 117: 157 - 167
- SAWITZKE AL, CHAPMAN SC, BLEYL SB, SCHOENWOLF GC (2004)
Improvements in histological quality and signal retention following in situ hybridization in early chick embryos using plastic resin and recolorization.
Biotech Histochem 80: 35 - 41
- SAWYER RG, KNAPP LW, O'GUIN, C (1986)
Epidermis, dermis and appendages.
In: Biology of the Integument, 2, Vertebrates (eds BEREITER-HAHN J, MATOLTSY AG, RICHARDS KR), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, pp 194–238
- SAXOD R (1978)
Combination of cholinesterase staining of nerves and stereoscopic viewing for three-dimensional study of skin innervation on whole mounts.
J Invest Dermatol 70: 95 – 97
- SAXOD R , PAYS L, HEMMING FJ (1996)
Development of the cutaneous nervous system.
Pathol Biol (Paris) 44: 838 – 848
- SCHNAPPER A (1997)
Direkte Zell-Zell-Interaktionen während der Wachstums- und funktionell-adaptiven Reifungsvorgängen im Skelett des Hundes
Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover
- SCHUBERT AL, SCHUBERT W, SPRAY DC, LISANTI MP (2002)
Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1.
Biochemistry 41: 5754 - 5764
- SENGEL P (1976)
Morphogenesis of Skin.
Cambridge Univ Press, New York
- SENGEL P, DHOUAILLY D, KIENY M (1969)
Aptitude of the skin constituents of the mid-ventral apterium of the chicken for forming feathers.
Dev Biol 19: 436 – 446
- SERRAS F, FRASER S, CHUONG CM (1993)
Asymmetric patterns of gap junctional communication in developing chicken skin.
Development 119: 85 – 96

- SEVERS NJ, SHOVEL KS, SLADE AM, POWELL T, TWIST VW, GREEN CR (1989)
Fate of gap junctions in isolated adult mammalian cardiomyocytes.
Circ Res 65: 22 – 42
- SIMPSON I, ROSE B, LOEWENSTEIN WR (1977)
Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels.
Science 195: 294 - 296
- SKERETT IM, ARONOWITZ J, SHIN JH, CYMES G, KASPAREK E, CAO FL, NICHOLSON BJ (2002)
Identification of amino acid residues lining the pore of a gap junctional channel.
J Cell Biol 159: 349 – 360
- SÖHL G, GILLEN C, BOSSE F, GLEICHMANN M, MÜLLER HW, WILLECKE K (1996)
A second alternative transcript of the gap junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve and modulated in injured sciatic nerve.
Eur J Cell Biol 69: 267 – 275
- SOSINSKY G (1995)
Mixing of connexins in gap junction membrane channels.
Proc Natl Acad Sci USA 92, 9210 – 9214
- SOSINSKY GE, JESIOR JC, CASPAR DL, GOODENOUGH DA (1988)
Gap junction structures: VIII. Membrane cross sections.
Biophys J 53, 709 – 722
- SOTKIS A, WANG XG, YASUMURA T, PERACCHIA LL, PERSECHINI A, RASH JE and PERACCHIA C (2001)
Calmodulin colocalizes with connexins and plays a direct in gap junction channel gating
Cell. Commun. Adhes. 8 (4-6): 277 - 281
- SPEARMAN RIC (1980)
The avian skin in relation to surface ecology.
Proc Roy Soc (Edinburgh) 79B: 57 – 74
- SPEARMAN RIC (1983)
Integumentary system
In: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Vol 4 (eds BELL DJ, FREEMAN BM) , Academic Press, London, New York, pp 211 – 217
- SPEARMAN RIC, HARDY JA (1985)
Integument.
In: Form and Function in Birds, Vol.3 (eds KING AS, MCLELLAND S), Academic Press, London, New York, pp 1 – 56
- SPRAY DC, FUJITA M, SAEZ JC, CHOI H, WATANABE T, HERTZBERG E, ROSENBERG LC, REID LM (1987)
Proteoglycans and glycosaminoglycans induce gap junction synthesis and function in primary liver cultures.
J Cell Biol 105, 541 – 551
- SPRAY DC, MORENO AP, KESSLER JA, DERMIETZEL R (1991)
Characterization of gap junctions between cultured leptomeningeal cells.
Brain Res 568: 1 – 14
- SPRAY DC, CHANSON M, MORENO AP, DERMIETZEL R, MEDA P (1991)
Distinctive gap junction channel types connect WB-cells, a clonal cell line derived from rat liver.
Am J Physiol 260, C513 – C527
- STAGG RB, FLETCHER WH (1990)
The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation.
Endoc Rev 11: 302 - 325

- STARCK, JM (1989)
Zeitmuster der Ontogenesen bei nestflüchtenden und nesthockenden Vögeln.
Courier Forschungsinstitut Senckenberg 114
- STETTENHEIM P (1974)
The integument of birds.
In: Avian Biology, Vol 2 (eds Farmer DS, King JR), Academic Press, London, New York, pp 1 – 63
- STEINKE L (1983)
Die Kunstbrut.
In: MEHNER A und HARTFIEL W (Hrsg.): Handbuch der Geflügelphysiologie Band 2 S. Karger, Basel-München-Paris-London-New York-Tokyo-Sydney 1054-1108
- STOUT CE, COSTANTIN JL, NAUS CC, CHARLES AC (2002)
Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexion hemichannels.
J Biol Chem 277: 10482 – 10488
- STUTENKEMPER R, GEISSE S, SCHWARZ HJ, LOOK J, TRAUB O, NICHOLSON BJ and WILLECKE K (1992)
The hepatocyte-specific phenotype of murine liver cells correlates with high expression of connexin32 and connexin26 but very low expression of connexin43
Exp. Cell. Res. 201 (1): 43 - 54
- TAKEDA A, HASHIMOTO E, YAMAMURA H, SHIMAZU T (1987)
Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C.
FEBS Lett 210: 169 – 172
- TAKEDA A, SAHEKI S, SHIMAZU T, TAKEUCHI N (1989)
Phosphorylation of the 27-kDa gap junction protein by protein kinase C in vitro and in rat hepatocytes.
J Biochem 106: 723 – 727
- TEN BROEK EM, LAMPE PD, SOLAN JL, REYNHOUT JK, JOHNSON RG (2001)
Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP.
J Cell Biol 155: 1307 – 1318
- TOYOFUKU T, YABUKI M, OTSU K, KUZUYA T, HORI M, TADA M (1998)
Direct association of the gap junction protein connexin43 with ZO-1 in cardiac myocytes.
J Biol Chem 273: 12725 - 12731
- TRAUB O, LOOK J, PAUL D, WILLECKE K (1987)
Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes.
Eur J Cell Biol 43, 48 – 54
- TRAUB O, LOOK J, DERMIETZEL R, BRÜMMER D, HUSLLER D, WILLECKE K (1989)
Comparative characterization of the 21-kDa and 26-kDa gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes.
J Cell Biol 10: 1039 – 1051
- TREXLER EB, BENNETT MV, BARGIELLO TA, VERSELIS VK (1996)
Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel
Proc Natl Acad Sci USA 93: 5836 – 5841
- TROSKO JE and RUCH RF (1998)
Cell-cell communication in cardiogenesis
Front. Biosci. 3: 208 – 236 review

- TURIN L and WARNER A (1977)
Carbon dioxide reversibly abolishes ionic communication between cells of early amphibian embryos.
Nature 270: 56 - 57
- UNGER VM, KUMAR NM, GILULA NB, YEAGER M (1997)
Projection structure of a gap junction membrane channel at 7 Å resolution.
Nat Struct Biol 4: 39 - 43
- UNGER VM, KUMAR NM, GILULA NB, YEAGER M (1999)
Three-dimensional structure of recombinant gap junction membrane channel.
Science 283: 1176 - 1180
- UNWIN PN (1989)
The structure of ion channels in membranes of excitable cells.
Neuron 3: 665 – 676
- UNWIN PN, ZAMPIGHI G (1980)
Structure of the junction between communicating cells.
Nature 283: 545 – 549
- VALIUNAS V (2002)
Biophysical properties of connexin-45 gap junction hemichannels studied in vertebrate cells.
J Gen Physiol 119: 147 – 164
- VALIUNAS V, WEINGART R (2000)
Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells.
Pflügers Arch 440: 366 – 379
- VAN ELDIK LJ, HERTZBERG EL, BERDAN RC, GILULA NB (1985)
Interaction of calmodulin and other calcium-modulated proteins with mammalian and arthropod junctional membrane proteins.
Biochem Biophys Res Commun 126: 825 - 832
- VANOYE CG, VERGARA LA, REUSS L (1999)
Isolated epithelial cells from amphibian urinary bladder express functional gap junctional hemichannels.
Am J Physiol Cell Physiol 276: C279 – C284
- VAUGHIN DK, LASATER EM (1992)
Acid phosphatase localization in endocytosed horizontal cell gap junctions.
Vis Neurosci 8: 77 - 81
- VEENSTRA RD, WANG HZ, BEYER EC, BRINK PR (1994a)
Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45.
Circ Res 75: 483 – 490
- VEENSTRA RD, WANG HZ, BEYER EC, RAMANAN SV, BRINK PR (1994b)
Connexin37 forms high conductance gap junction channels with subconductance state activity and selective dye and ionic permeabilities.
Biophys J 66, 1915 – 1928
- VEENSTRA RD, WANG HZ, BEBLO DA, CHILTON MG, HARRIS AL, BEYER EC, BRINK PR (1995)
Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance.
Circ Res 77: 1156 – 1165
- VERSELIS V, BENNETT MVL, SPRAY DC and WHITE RL (1986)
Gap junctional conductance and permeability are linearly related
Science 234: 461 - 464
- WARN-CRAMER BJ, LAMPE PD, KURATA WE, KANEMITSU MY, LOO LWM, ECKHART W, LAU AF (1996)
Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin43 gap junction protein.
J Biol Chem 271: 3779 – 3786

- WARNER A (1988)
The gap junction
J. Cell. Sci. 89: 1-7
- WARNER AE (1992)
Gap junctions in development – a perspective
Semin Cell Biol 3: 81 – 91
- WARNER AE, LAWRENCE PA (1982)
Permeability of gap junctions at the segmental border in insect epidermis.
Cell 28: 243 – 252
- WARNER AE, GUTHRIE S, GILULA NB (1984)
Antibodies to gap junctional proteins selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo.
Nature 311: 127 – 131
- WEIR MP, LO CW (1982)
Gap junctional communication compartments in the *Drosophila* wing disk
Proc Natl Acad Sci USA 79: 3232 - 3235
- WESSELS E, ROESSNER D (1965)
Non proliferation in dermal condensation of mouse vibrissae and pilage hairs.
Dev Biol 12: 419 - 433
- WHITE TW, BRUZZONE R, WOLFRAM S, PAUL DL, GOODENOUGH DA (1994)
Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins.
J Cell Biol 125: 879 – 892
- WHITE TW , PAUL DL, GOODENOUGH DA, BRUZZONE R (1995)
Functional analysis of selective interactions among rodent connexins.
Mol Biol Cell 6: 459 – 470
- WHITE TW, BRUZZONE R (1996)
Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequence.
J Bioenerg Biomembr 28: 339 - 350
- WIDELITZ RB, JIANG TX, YU M, SHEN T, SHEN J-Y, WU P, CHUONG C-M (2003)
Molecular biology of feather morphogenesis: a testable model for evo-devo research.
J Exp Zool 289B: 109 – 122
- WIENER EC and LOEWENSTEIN WR (1993)
Correction of cell-cell communication defect by introduction of a protein kinase into mutant cells
Nature 305: 433 - 439
- WILLECKE K, HENNEMANN H, DAHL E, JUNGBLUTH S, HEYNKES R (1991)
The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins.
Eur. J. Cell Biol. 56: 1 – 7
- WILLECKE K, EIBERGER J, DEGEN J, ECKARDT D, ROMUALDI A, GULDENAGEL M, DEUTSCH U, SOHL G (2002)
Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and humane genome.
Biol Chem 383: 725 - 737
- WINTERHAGER E, GRÜMMER R, JAHN E, WILLECKE K, TRAUB O (1993)
Spatial and temporal expression of connexin26 and connexin43 in rat endometrium during trophoblast invasion.
Dev Biol 157, 399 – 409
- WIRTH U (1993)
Histologische und histochemische Untersuchungen zur Embryonalentwicklung der Vogelhaut
Diplomarbeit, Institut für Zoologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

- WRENCH R, HARDY JA, SPEARMAN RIC (1980)
 Sebokeratocytes of avian epidermis – with mammalian comparisons.
In: The Skin of Vertebrates (ed SPEARMAN RIC), Academic Press, London, pp 47–56
- YAMANAKA I, KURAOKA A, INAI T, ISHIBASHI T, SHIBATA Y (2001)
 Differential expression of major gap junction proteins, connexins 26 and 32, in rat mammary glands during pregnancy and lactation.
Histochem Cell Biol 115: 277 - 284
- YAMASAKI H (1990)
 Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis.
Carcinogenesis 11: 1051 - 1058
- YANCEY SB, JOHN SA, RATNESHWAR L, AUSTIN BJ, REVEL JP (1989)
 The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology and functional domains.
J Cell Biol 108: 2241 – 2254
- YEAGER M, GILULA NB (1992)
 Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels.
J Mol Biol 223: 929 – 948
- YEAGER M, UNGER VM, FALK MM (1998)
 Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels.
Curr Opin Struct Biol 8: 517 – 524
- YEAGER M (1998)
 Structure of cardiac gap junction intercellular channels.
J Struct Biol 121: 231 – 245
- YEH HI, ROTHERY S, DUPONT E, COPPEN SR, SEVERS NJ (1998)
 Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium.
Circ Res 83: 1248 – 1263
- YOTTI LP, CHONG CC, TROSKO JE (1979)
 Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a turn-over promoter.
Science 206: 1089 - 1091
- YU M, YUE Z, WU P, WU D-Y, MEYER J-A, MEDINA M, WIDELITZ RB, JIANG T-X, CHUONG C-M (2004)
 The developmental biology of feather follicles.
Int J Dev Biol 48: 181 - 191
- ZHANG JT, NICHOLSON BJ (1994)
 The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions.
J Membr Biol 139: 15 – 29
- ZHOU XW, PFAHNL A, WERNER R, HUDDER A, LLANES A, LUEBKE A, DAHL G (1997)
 Identification of a pore lining segment in gap junction hemichannels.
Biophys J 72: 1946 - 1953
- ZIMMER DB, GREEN CR, EVANS WH, GILULA NB (1987)
 Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures.
J Biol Chem 262: 7751 – 7763

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

In Marburg: Herr R. Jacob

In Göttingen: Herr Bandelow, Herr Bärner, Herr Becker, Frau Binder, Herr Brockmüller, Herr Burckhardt, Herr Dierks, Herr Emons, Herr Erdlenbruch, Herr Friedrich, Herr Füseci, Herr Glaß, Herr Groß, Herr Hallier, Herr Hasenfuß, Herr Hellige, Herr Herken, Herr Horstmann, Herr Hüfner, Herr Hustert, Herr Klockgether-Radke, Herr Knepel, Herr Kuhn, Herr Laskawi, Herr Müller, Frau Neumann, Herr Oellerich, Herr Paul, Herr Petersen, Herr Pieske, Herr Radzun, Herr Ramadori, Herr Richter, Herr Ringert, Herr Rüdiger, Herr Saturnus, Herr Schultz, Herr Schweigerer, Herr Schwörer, Herr Steiner, Herr Strutz, Herr Stürmer, Herr Trümper, Herr von Figura, Herr Wiese, Herr Zeeck, Herr Zerr, Herr Zimmermann, Herr Zöllner

In Hannover: Herr Meyer

Danksagung

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf Jacob sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die wertvolle technische Unterstützung durch die AG Jacob am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg.

Herrn Prof. Dr. Wilfried Meyer danke ich für die Einführung in die histologische und histochemische Technik und die Möglichkeit, zeitweilig in seiner Abteilung Histologie und Embryologie des Anatomischen Instituts der Tierärztlichen Hochschule Hannover arbeiten zu können. In diesem Zusammenhang möchte ich zudem Frau Marion Gähle ganz herzlich meinen Dank für ihre engagierte technische Hilfe aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo, Institut für Biophysik der Universität Hannover, danke ich für die freundliche Überlassung der cDNA für die Durchführung der In-situ-Hybridisierung.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Neumann, Direktor der Geflügelklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover, und seinen Mitarbeitern bin ich sehr dankbar für die freundliche Bereitstellung der untersuchten Entwicklungsstadien der Hühnerrasse „White Leghorn“.

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an meine Familie und Herrn Jann-Aike Diekmann für die sorgfältige Durchsicht der Dissertation, vielfältige Unterstützung und Geduld.

Vielen Dank weiterhin an alle, die ich nicht persönlich genannt habe, die mir aber mit Rat und Tat jederzeit freundlich zur Seite standen.